Aus dem Pharmakologischen Institut der Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Trendelenburg

Die Metabolisierung von ^{3}H-Isoproterenol in der Glandula submandibularis der Ratte. Ein Beitrag zur Untersuchung der extraneuronalen O-Methylierung von Katecholaminen.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Inge Sauerwein

aus Zeilhard

Würzburg, den 25. 1. 1980

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Trendelenburg

Die Metabolisierung von ^{3}H-Isoproterenol in der Glandula submandibularis der Ratte. Ein Beitrag zur Untersuchung der extraneuronalen O-Methylierung von Katecholaminen.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Inge Sauerwein

aus Zeilhard

Würzburg, den 25. 1. 1980

Referent: PD Dr. med. K.-H. Graefe

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A) Einleitung

B) Methodik

1. Vorbereitung
2. Versuchsprotokoll
3. Bestimmung des Extrazellulärraums
4. Säulenchromatographische Analyse zur Trennung von ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol
5. Messung der Radioaktivität
6. Mathematische Auswertung und Statistik
7. Verwendete Substanzen

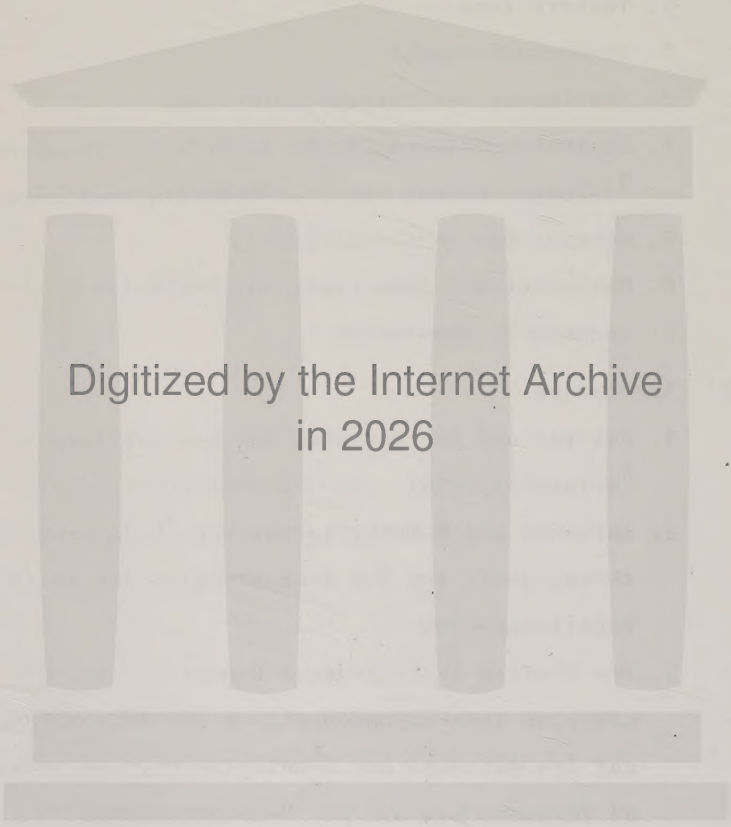
C) Ergebnisse

1. Zeitverlauf der Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol
2. Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in Abhängigkeit von der Konzentration des Amins im Inkubationsmedium
3. Der Einfluß verschiedener Hemmstoffe und einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung auf die Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol
   a) Versuche mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol
   b) Versuche mit hohen ^{3}H-Isoproterenolkonzentrationen

D) Diskussion der Ergebnisse

E) Zusammenfassung

Literaturverzeichnis


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0014

A) Einleitung

Innerhalb des sympathischen Nervensystems wird eine abgestufte ergotrope Reaktion, d.h. eine graduelle Anpassung des Organismus an äußere und innere Erfordernisse durch zwei Mechanismen gewährleistet:

1) Katecholamine werden aus dem Nebennierenmark direkt an das Blut abgegeben, so daß alle mit Noradrenalin-Rezeptoren ausgestattete Zellen in eine generalisierte Reaktion des Organismus miteinbezogen werden.

2) Die sympathische Innervation der einzelnen Organe und damit die Freisetzung des Neurotransmitters Noradrenalin aus den Varikositäten der postganglionären Nervenenden ermöglicht eine lokal begrenzte Reaktion, weil ausschließlich die unmittelbar aktivierte Effektorzelle erreicht wird.

Die Möglichkeit eines spezifischen Aufnahmemechanismus von exogen zugeführten Katecholaminen in peripheren Geweben wurde schon 1932 von Burn postuliert. Bei der Verabreichung von hohen Dosen Noradrenalin nimmt das Gewebe entsprechend seinem Gehalt an noradrenergen Terminalfasern unterschiedliche Mengen des Amins aus dem Extrazellulärraum auf. Raab und Gigee (1955) und Strömblad und Nickerson (1961) stellten diese Zunahme des Noradrenalingehalts im Herzen und in den Speicheldrüsen verschiedener Tiere fest. Durch chirurgische Denervierung (Hertting et al., 1961; Strömblad und Nickerson, 1961) und durch immunologische Denervierung (Zaimis et al., 1965; Iversen et al., 1966) wurde die Noradrenalinaufnahme in die Gewebe erheblich vermindert. Damit war bewiesen, daß der größte Teil der Noradrenalinaufnahme in die sympathischen Nervenendigungen erfolgt. Deshalb wurde dieser Aufnahmeprozess auch als neuronale Aufnahme bezeichnet. Mit der von Falck et al. (1962) entwickelten histochemischen Fluoreszenztechnik wurde dann festgestellt, daß der neuronale Aufnahmeprozess auf der Stufe der Zellmembran lokalisiert ist (Übersicht bei Iversen, 1967). Die neuronale Aufnahme wurde erstmals am perfundierten Rattenherzen kinetisch charakterisiert (Iversen, 1963, 1967). Es handelt sich dabei um einen ener-

gieverbrauchenden, aktiven Prozess, bei dem Noradrenalin mittels eines Carriersystems gegen einen Konzentrationsgradienten in die Nervenenden eingeschleust wird. Der Aufnahmeprozess ist temperaturabhängig, sättigungsfähig und hat eine hohe Affinität für Noradrenalin, wobei eine Stereoselektivität für das in der Natur vorkommende (-)-Noradrenalin besteht (Iversen, 1963; Iversen et al., 1971; Hendley und Snyder, 1972). Außerdem ist die neuronale Aufnahme von der Na^+-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit abhängig (Iversen und Kravitz, 1966; Bogdanski und Brodie, 1969, Gillis und Paton, 1967). Auch eine gewisse K^+-Konzentration ist für die neuronale Aufnahme notwendig, während hohe K^+-Konzentrationen das Carriersystem hemmen.

Bei seinen Untersuchungen am perfundierten Rattenherzen fand Iversen (1965 und 1967) einen zweiten Aufnahmeprozess, den er als "uptake$_2$" der bis dahin bekannten neuronalen Aufnahme ("uptake$_1$") gegenüberstellte. Beide Prozesse unterscheiden sich unter anderem durch ihre kinetischen Eigenschaften (Iversen, 1967). Die Akkumulation von Noradrenalin im Gewebe durch "uptake$_2$" ließ sich z.B. erst bei Aminkonzentrationen nachweisen, bei denen die neuronale Aufnahme praktisch schon gesättigt war. Während Iversen diesen Aufnahmeprozess zunächst für einen zweiten neuronalen Mechanismus hielt, konnten Ehinger und Sporrong (1968), Farnebo und Malmfors (1969) und Clarke et al. (1969) beweisen, daß "uptake$_2$" auf der extraneuronalen Aufnahme von Katecholaminen beruht. Später dann stellten Lightman und Iversen (1969) fest, daß das von Iversen (1965) beobachtete "Schwellenphänomen" (d.h. Akkumulation von Noradrenalin erst bei relativ hohen Aminkonzentrationen) ein Kunstprodukt war. Sie untersuchten jetzt nämlich nicht nur den Gehalt des Gewebes an unverändertem Noradrenalin sondern bestimmten auch die Metabolite im Gewebe. Dadurch konnten sie zeigen, daß bei niedrigen Noradrenalinkonzentrationen fast ausschließlich Amin-Metabolite im Gewebe nachweisbar waren, so daß die extraneuronale Akkumulation des unveränderten Noradrenalins nur nach Hemmung oder

Sättigung der das Noradrenalin abbauenden Enzyme meßbar und damit nachweisbar wird. Daraus folgt, daß man zu Aussagen über die Aufnahme von Noradrenalin in extraneuronale Gewebe nur berechtigt ist, wenn man die Summe der insgesamt gebildeten Metabolite mitbestimmt. Die Untersuchungen von Lightman und Iversen (1969) und spätere Untersuchungen von Bönisch und Trendelenburg (1974) sowie Fiebig und Trendelenburg (1978 a) zeigen deutlich, daß die extraneuronale Aufnahme "uptake$_2$" auch bei niedrigen Aminkonzentrationen zur Inaktivierung von Katecholaminen beiträgt.

Die vorrangige physiologische Aufgabe der neuronalen Aufnahme besteht darin, das in den synaptischen Spalt freigesetzte Noradrenalin zu eliminieren (Whitby et al., 1961; Trendelenburg, 1963; Iversen, 1967). Außerdem scheint die neuronale Aufnahme für die Transmitter-Ökonomie von Bedeutung zu sein (Iversen, 1975). Die wichtige Rolle der neuronalen Aufnahme für die Transmitterinaktivierung geht eindeutig aus experimentellen Beobachtungen hervor, die zeigen, daß Hemmstoffe der neuronalen Aufnahme (z.B. Cocain und trizyklische Antidepressiva) die Reizantwort auf sympathische Nervenreize verstärken und die Wirkungen von exogenem Noradrenalin in sympathisch innervierten Organen potenzieren (d.h. die Dosis-Wirkungskurven für α- und ß-Wirkungen von Noradrenalin in niedrigere Konzentrationsbereiche nach links verschieben; Übersicht bei Trendelenburg, 1972). In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß die Halbsättigungskonstante (K_m) für die neuronale Aufnahme von Noradrenalin bei etwa 1 µM liegt (Iversen, 1967; Paton, 1976), d.h. in einem Konzentrationsbereich, in dem Noradrenalin üblicherweise α- und ß-Rezeptoren erregt.

Die physiologische Bedeutung der extraneuronalen Aufnahme als Inaktivierungsweg für Noradrenalin ist dagegen noch strittig. Als akkumulierendes System (gekennzeichnet durch Anreicherung unveränderten Amins in den Zellen mit nachfolgendem Ausfließen aus den Zellen entsprechend der aufgebauten Konzentrationsgradienten) könnte die extraneuronale Aufnahme eine wichtige Rolle kaum übernehmen, denn der K_m von Noradrenalin für diesen Membrantransport-

prozess liegt zwischen 60 und 500 µM (Iversen, 1965; Gillespie und Towart, 1973; O'Donnell und Saar, 1978; Fiebig und Trendelenburg, 1978 b; Bönisch, 1978). Wenn man außerdem berücksichtigt, daß die extraneuronale Akkumulation von Noradrenalin erst bei relativ hohen Aminkonzentrationen (> 6 µM) nachweisbar ist (Iversen, 1965) und daß in den Dosis-Wirkungsbeziehungen maximale Noradrenalinwirkungen meist schon bei einer Konzentration von 10 µM beobachtet werden, wird verständlich, daß man lange Zeit nicht so recht an eine physiologische Bedeutung der extraneuronalen Aufnahme glauben konnte. Trotzdem ist bekannt, daß Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme wie z.B. Corticosteroide (Iversen und Salt, 1970) die Wirkung von exogenem Noradrenalin potenzieren und zwar immer dann, wenn die Empfindlichkeit der untersuchten Organe gegenüber Noradrenalin hoch ist (Besse und Bass, 1966; Kalsner, 1969, 1974; Kaumann, 1972; Graefe und Trendelenburg, 1974; Johnson und de la Lande, 1978). Die potenzierende Wirkung von Corticosteroiden verschwand, wenn vorher die Empfindlichkeit der Organe durch Blocker der Noradrenalin-Rezeptoren künstlich vermindert (d.h. die Dosis-Wirkungskurve in höhere Konzentrationsbereiche nach rechts verschoben) wurde (Kaumann, 1972; Graefe und Trendelenburg, 1974; Johnson und de la Lande, 1978). Dieser Typ der Überempfindlichkeit war nicht nur nach Hemmung der extraneuronalen Aufnahme, sondern auch nach Hemmung der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT, ein hauptsächlich extraneuronal lokalisiertes, intrazelluläres Enzym) beobachtet worden (Trendelenburg et al., 1971), wobei sich die potenzierenden Wirkungen der Corticosteroide und der Hemmstoffe der COMT niemals addieren ließen (Kalsner, 1969; Levin und Furchgott, 1970, Kaumann, 1970, 1972; Graefe und Trendelenburg, 1974). Da außerdem die potenzierende Wirkung von Corticosteroiden (oder Hemmstoffen der COMT) nur dann in Erscheinung trat, wenn die Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin oder Isoproterenol (nicht aber, wenn Amine ohne Katecholgruppierung) als Agonisten verwendet wurden, haben Kaumann (1972) und Trendelenburg (1972) an die Möglichkeit der Existenz eines extraneuronalen, O-methylierenden Systems (Aufnahme gefolgt von O-Methylierung des Substrats) mit hoher Affinität für Katecholamine

($K_m \sim 10$ µM) gedacht. Derartige hochaffine, O-methylierende Systeme, die durch Corticosteroide hemmbar sind, wurden in der Zwischenzeit in verschiedenen Organen beschrieben (Nickhaut der Katze: Graefe und Trendelenburg, 1974; perfundiertes Rattenherz: Bönisch et al., 1974 sowie Fiebig und Trendelenburg, 1978 b; Kaninchenaorta: Henseling, 1978). Diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß die extraneuronale Aufnahme mit nachfolgender O-Methylierung eine gewisse physiologische Bedeutung bei der Inaktivierung extrazellulären Noradrenalins und Adrenalins hat.

Der größte Teil der bereits zitierten Arbeiten über die extraneuronale Inaktivierung von Katecholaminen beschäftigt sich mit Geweben mesenchymaler Herkunft (Herzmuskulatur, glatte Gefäßmuskulatur). Es ist aber schon seit geraumer Zeit bekannt, daß auch das Drüsengewebe von Speicheldrüsen zur (extraneuronalen) Aufnahme von Katecholaminen befähigt ist (Andén et al., 1963; Fischer et al., 1965). Histochemische Untersuchungen haben eindeutig bestätigt, daß Katecholamine in das Parenchym der Speicheldrüsen aufgenommen werden (Hamberger et al., 1967). Auch in der Speicheldrüse ist die COMT ein wichtiges extraneuronales Enzym und der Aufnahmeprozess in der Plasmamembran der Drüsenzelle hat Eigenschaften, die denen der extraneuronalen Aufnahme in mesenchymalen Geweben entsprechen (Übersicht bei Almgren und Jonason, 1975, 1976; Major, 1979). In einer im Jahre 1963 erschienenen Arbeit haben Almgren und Jonason gezeigt, daß Corticosteron (als Hemmstoff der extraneuronalen Aufnahme) an der Submandibulardrüse der Ratte die sekretorische Wirkung von Noradrenalin unter bestimmten experimentellen Bedingungen potenziert. Es war deshalb von Interesse, die Kinetik der Aufnahme und O-Methylierung eines Katecholamins an diesem Organ zu untersuchen. Es ergab sich nämlich die Frage, ob auch an diesem Organ ein hochaffines, O-methylierendes System zur Inaktivierung von Katecholaminen beiträgt. Um diese Frage zu beantworten, wurde in der vorliegenden Arbeit die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol über einen großen Konzentrationsbereich in inkubierten Gewebsproben der Submandibular-

drüse der Ratte gemessen. Isoproterenol diente als Modellsubstrat, denn dieses Katecholamin ist weder ein Substrat der neuronalen Aufnahme (Hertting, 1964) noch ein Substrat der Monoaminoxidase (Blaschko, 1952). Isoproterenol wird aber extraneuronal mit hoher Geschwindigkeit aufgenommen (Callingham und Burgen, 1966; Bönisch und Trendelenburg, 1974) und nur von der COMT (zu O-Methylisoproterenol) metabolisiert (Hertting, 1964). Auch in der Speicheldrüse der Ratte wird Isoproterenol aufgenommen und O-methyliert (Almgren und Jonason, 1974). Die sättigungskinetischen Konstanten für die Isoproterenolaufnahme in dieses Organ sind von Major (1979) bestimmt worden (K_m = 311 µM; V_{max} = 101 nMol g^{-1} min^{-1}); sie unterscheiden sich nur unwesentlich von denen, die von Bönisch (1978) am perfundierten Rattenherzen ermittelt wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß in der Speicheldrüse wie in einigen anderen Organen (s.oben) ein O-methylierendes System existiert, das mit relativ niedrigen Isoproterenolkonzentrationen gesättigt werden kann und dessen Fähigkeit, Isoproterenol zu metabolisieren durch Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme beeinträchtigt wird.

B) Methodik

1. Vorbereitung

Versuchstiere waren männliche Wistar-Ratten mit einem mittleren Gewicht von 200 g. Sie wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Die entnommenen Speicheldrüsen (Glandulae submandibulares) wurden sofort in eiskalte Krebs' Lösung gelegt, die mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) durchströmt wurde. Die Krebs' Lösung hatte folgende Zusammensetzung (in mM):
NaCl 118.1, KCl 4.7, $CaCl_2$ 1.9, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $NaHCO_3$ 25.0, D-Glucose 5.0, EDTA 0.04 sowie Askorbinsäure 0.568.

Jede Drüse wurde mit Hilfe eines Stadie-Riggs-Mikrotoms in je vier Gewebsscheibchen mit einem Gewicht von 20 - 40 mg und einer Dicke von ca. 0.5 mm zerlegt; ich benötigte zu jedem Versuch 8 Gewebsstückchen. Jedes einzelne wurde mit einem Baumwollfaden an einem Plastikstab befestigt und in eiskalte, mit Carbogen gesättigte Krebs' Lösung überführt.

In einigen Versuchen war es notwendig, den endogenen Noradrenalingehalt der Speicheldrüsen drastisch zu senken. Zu diesem Zweck wurden die Tiere mit Reserpin vorbehandelt. Sie erhielten jeweils zwei Reserpininjektionen s.c., 5 mg/kg 20 Stunden vor dem Versuch und 2.5 mg/kg 3 Stunden vor dem Versuch.

2. Versuchsprotokoll

Alle Gewebsproben wurden bei 37°C in Zentrifugengläsern inkubiert, die 4 ml Krebs' Lösung enthielten. Vom Boden der Gläschen aus wurde die Krebs' Lösung kräftig mit Carbogen durchperlt. Nach einer 30 min dauernden Vorinkubation, die der Anpassung des Gewebes an die in vitro Bedingungen diente, wurden die Gewebsstückchen in das Testmedium überführt, das etwa 1µ Ci/ml ^{3}H-Isoproterenol (spezifische Aktivität: 4.9 - 6.4 Ci/mMol) und verschiedene Konzentrationen nicht markierten Isoproterenols enthielt. Die Endkonzentra-

tionen des Isoproterenols lagen zwischen 0.2 und 300 µM. Die Dauer der Inkubation mit dem Testmedium betrug 0.5 bis 8 min.

Um den Einfluß von Hemmstoffen der extraneuronalen Aufnahme auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol zu untersuchen, wurde dem Testmedium 30 µM Phenoxybenzamin, Corticosteron, 17-ß-Oestradiol oder Normetanephrin (Iversen, 1965; Iversen und Salt, 1970) zugesetzt. Bei diesen Versuchen wurden die Gewebsproben aber nicht nur während der Inkubation mit dem Testmedium, sondern auch während der zweiten Hälfte der Vorinkubation (d.h. schon 15 min vorher) den Hemmstoffen ausgesetzt. In gleicher Weise wurden auch Versuche mit 30 µM Cocain (einem Hemmstoff der neuronalen Aufnahme; Iversen, 1963) oder 100 µM 3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-0521 - einem Hemmstoff der COMT; Giles und Miller, 1967) und 17 mM Äthanol (als Lösungsvermittler verwendet) durchgeführt. Stammlösungen der verschiedenen Hemmstoffe wurden täglich frisch hergestellt und die Substanzkonzentration in den Stammlösungen wurde so bemessen, daß der Zusatz zum Inkubationsbad 0.5% des Gesamtvolumens nicht überstieg. Normetanephrin und Cocain wurden in aqua bidest. gelöst, während die Stammlösungen für Phenoxybenzamin, Corticosteron und 17-ß-Oestradiol unter Verwendung von absolutem Äthanol hergestellt wurden. Die Endkonzentration von Äthanol im Inkubationsbad betrug 17 mM. Es ist bekannt, daß diese Äthanolkonzentration keinen Einfluß auf die extraneuronale Aufnahme und Metabolisierung von Katecholaminen hat (Graefe und Trendelenburg, 1974; siehe auch eigene Ergebnisse in Abb. 5).

In einigen Versuchen wurde die Ionenzusammensetzung der Krebs' Lösung verändert. Und zwar wurde eine Inkubationslösung verwendet deren Na^{+}-Konzentration von 143 auf 25 mM herabgesetzt wurde. Um die Osmolarität der Lösung konstant zu halten, wurde in diesen Versuchen 118 mM NaCl entweder durch 236 mM Saccharose oder durch 118 mM KCl ersetzt, d.h. die Na^{+}-Konzentration der Lösung entweder ohne oder mit gleichzeitiger Veränderung der K^{+}-Konzentration vermindert. Zur Herstellung einer Ca-freien Krebs' Lösung wurde

die Lösung ohne $CaCl_2$ angesetzt. In diesem speziellen Fall enthielt die Lösung 1 mM EGTA (mit Tris-Base gepuffert), um aus dem Gewebe austretende Ca-Ionen zu binden. In allen Versuchen, in denen eine Inkubationslösung mit veränderter Ionenzusammensetzung verwendet wurde, geschah dies nicht nur während der Inkubation mit dem Testmedium, sondern auch während der letzten 15 min der Vorinkubation. Einzige Ausnahme waren Versuche mit Ca-freier Krebs' Lösung; in diesem Fall wurden die Gewebsproben von Anfang an (d.h. während der gesamten Vorinkubation) in Ca-freier Lösung inkubiert.

Am Ende der Inkubation mit dem Testmedium wurde das Gewebe für 10 s in eiskalte Krebs' Lösung überführt und gespült. Anschließend wurde das Gewebe von den Plastikstäbchen entfernt, kräftig mit Filterpapier getrocknet und gewogen. Es wurde dann in 3 ml eiskalter 0.4 N Perchlorsäure homogenisiert (Ganzglashomogenisator); die Perchlorsäure enthielt als Oxidationsschutz 2.7 mM Na_2-EDTA und 9.9 mM Na_2SO_3. Der perchlorsaure Gewebsextrakt wurde durch Zentrifugation (10 min bei 3000 · g; 5°C) von dem ausgefällten Eiweiß und dem Zelldetritus getrennt. Vom Säureextrakt wurden 0.5 ml zur direkten Bestimmung der Radioaktivität verwendet (s. Abschnitt B 5) und 2 ml säulenchromatographisch analysiert, um ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol voneinander zu trennen (s. Abschnitt B 4). Um die Wiederauffindungsquote der im Gewebsextrakt befindlichen Radioaktivität zu bestimmen, wurde in jedem Versuch ein Gewebsstückchen, das nicht inkubiert worden war, mit Perchlorsäure und einer bekannten Menge ^{3}H-Isoproterenol versetzt und homogenisiert. Diese "Gewebsextrakte" wurden wie alle anderen Gewebsextrakte der oben beschriebenen Prozedur (einschließlich der säulenchromatographischen Analyse) unterzogen. Die Wiederauffindungsquote der Radioaktivität im Säureextrakt betrug 95 - 98%; die Ergebnisse wurden entsprechend korrigiert.

Von den Inkubationsbädern (Testmedium) wurde nach Beendigung der Inkubation ein aliquoter Teil (0.1 ml) zur direkten Bestimmung

der Radioaktivität verwendet und in einigen Versuchen ein anderer (1.0 ml) zur vorübergehenden Aufbewahrung bei -20°C mit 0.2 ml einer 0.2 N HCl versetzt. Die mit HCL angesäuerte Probe der Inkubationslösung wurde in gleicher Weise wie die Gewebsextrakte säulenchromatographisch analysiert (s. Abschnitt B 4). In den Versuchen, in denen die Inkubationsbäder säulenchromatographisch untersucht wurden (zur Bestimmung ihres Gehaltes an ^{3}H-O-Methylisoproterenol) wurden auch Testmedia, die ohne Gewebe "inkubiert" worden waren, der Prozedur der Säulenchromatographie unterworden (zur Erklärung s. Abschnitt B 4).

Das oben erwähnte kurzzeitige Waschen der Gewebsproben in eiskalter Krebs' Lösung nach Beendigung der Inkubation war ein wichtiges Detail des Versuchsprotokolls. Durch diese Maßnahme wurde die extraneuronale Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol abrupt gestoppt und die an der Gewebsoberfläche haftende Radioaktivität abgespült. In Vorversuchen wurde z.B. beobachtet, daß mit ^{3}H-Isoproterenol inkubierte Gewebsproben (0.2 µM; 1 min), die ohne vorherige Abkühlung getrocknet und gewogen wurden, wesentlich mehr ^{3}H-O-Methylisoproterenol enthielten als solche, die nach Beendigung der Inkubation zunächst in eiskalter Krebs' Lösung gewaschen und danach erst getrocknet wurden (80.5 $\pm$ 8.6 gegen 34.1 $\pm$ 3.0 pMol·g^{-1}; n = 5 bzw. 6). Diese Ergebnisse zeigen, daß im Extrazellulärraum verteiltes und an der Oberfläche haftendes ^{3}H-Isoproterenol während des Trocknens und Wiegens aufgenommen und O-methyliert wird. Von ähnlichen Beobachtungen haben Trendelenburg und Henseling (1976) mit ^{3}H-Noradrenalin als Substrat an der Kaninchenaorta berichtet.

3. Bestimmung des Extrazellulärraums

Die Gewebsproben wurden wie oben beschrieben präpariert und inkubiert, und zwar mit 0.2 µCi/ml ^{14}C-Sorbit (spezifische Aktivität = 200 mCi/mMol) und einer gewissen Konzentration nicht-markierten Sorbits (Endkonzentration : 50 µM). Von Sorbit ist bekannt, daß es sich praktisch nur im Extrazellulärraum des Gewebes verteilt

(Morgan et al., 1961; Iversen, 1965). Der ^{14}C-Gehalt des Gewebes, der als Maß für den Extrazellulärraum des Gewebes diente, wurde nach einer Inkubationsdauer von 0.5 bis 10 min bestimmt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Gewebe wurde nach Beendigung der Inkubation für 10 s in eiskalter Krebs' Lösung gewaschen, anschließend mit Filterpapier getrocknet und gewogen und dann in einem Zählfläschchen mit 1 ml 0.5 M Soluene 350 ^{R} (Packard Instruments) über Nacht bei 40^{o}C solubilisiert. Aus der ^{14}C-Aktivität dieser Probe und einem aliquoten Teil (0.1 ml) der Inkubationslösung am Ende der Inkubation wurde der Verteilungsraum (VR in $ml \cdot g^{-1}$) für Sorbit im Gewebe nach folgender einfachen Formel berechnet:

$$VR = \frac{dpm \cdot g^{-1} \text{ (Gewebe)}}{dpm \cdot ml^{-1} \text{ (Bad)}}$$

(wobei dpm absolute ^{14}C-Zerfälle pro min bedeutet). Der Sorbit Verteilungsraum des Gewebes wurde als Schätzwert für den Extrazellulärraum angesehen.

4. Säulenchromatographische Analyse zur Trennung von ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol

Verwendet wurden Al_2O_3-Säulen (Adsorption von ^{3}H-Isoproterenol) und Dowex 50 W x 4-Säulen (Adsorption von ^{3}H-O-Methylisoproterenol). Al_2O_3 und Dowex 50 W x 4 wurden vor der Verwendung in der Säulenchromatographie einer Waschprozedur unterworfen und gereinigt.

Al_2O_3 (standardisiert, Aktivitätsstufe II - III der Fa. Merck) wurde im Rückflußkühler mit 2N HCl 4 - 5 mal ca. 1 h gekocht, bis der Überstand einigermaßen farblos war. Das so gereinigte Al_2O_3 wurde dann 12 bis 14 mal mit aqua dest. und 2 mal mit 0.2 M Na-Acetat gewaschen. Danach wurde das Al_2O_3 bei 100^{o}C im Trockenschrank getrocknet.

Dowex 50 W x 4 (200 - 400 mesh) wurde 5 bis 6 mal mit 2 N NaOH, die 10 g EDTA pro Liter enthielt, bei 50°C unter ständigem Rühren gewaschen bis der Überstand farblos war. Dann wurde das Dowex mit aqua bidest. so lange gewaschen bis der Überstand neutral war (pH 5-7). Danach wurde das Harz 5 mal mit 2 N HCl und dann wieder mit aqua bidest. gewaschen bis der Überstand neutral war. Danach folgten 2 Waschvorgänge mit HCl-Alkohol (6 N HCl: Äthanol = 1:1; v/v), mehrere Waschvorgänge mit aqua bidest. und zum Schluß wurde das Harz mit 0.01 N HCl equilibriert.

Vor jedem Versuch wurden die Chromatographierohre (Innendurchmesser = 0.5 cm) am unteren Ende mit Glaswolle abgedichtet und mit 200 mg Al_2O_3 oder bis zu einer Höhe von 1.5 cm mit Dowex aufgefüllt. Ehe die Säulen verwendet wurden, wurde das Al_2O_3 mit 5 ml 0.2 M Na-Acetat und das Dowex mit 2 mal 2 ml aqua bidest. gewaschen. Dann wurden die Säulen nach Art einer Kaskade übereinander gestellt, wobei die Al_2O_3-Säulen über den Dowex-Säulen plaziert wurden. Die verschiedenen Proben (Gewebsextrakt oder HCl-saures Inkubationsmedium) wurden nach Zusatz von Na_2-EDTA (0.1 ml einer 10%-igen Lösung) und Na-Sulfit (0.1 ml einer 12.5%-igen Lösung) mit 1 M Trispuffer auf einen pH von 8.1 - 8.4 eingestellt und auf die Säulenkaskade aufgetragen. Danach wurden die Säulen 2 mal mit 2 ml aqua bidest. gespült, wobei sowohl der Effluent der Al_2O_3-Säulen als auch das Waschwasser direkt in die darunter plazierten Dowex-Säulen tropften. Nun wurden die Al_2O_3-Säulen von den Dowex-Säulen getrennt und auch getrennt eluiert. Die Al_2O_3-Säulen wurden 2 mal mit 1.0 ml 0.2 N HCl eluiert. Diese Fraktion enthielt das ^{3}H-Isoproterenol. Die Dowex-Säulen wurden zunächst noch einmal mit 2 mal 2 ml aqua bidest. gewaschen und schließlich mit 2 mal 1.0 ml HCl-Alkohol (6 N HCl: Äthanol = 1:1; v/v) eluiert. Diese Fraktion enthielt das ^{3}H-O-Methylisoproterenol. Sowohl das Al_2O_3-Eluat als auch das Dowex-Eluat wurde direkt in den für die Bestimmung der Radioaktivität verwendeten Zählfläschchen aufgefangen. Das hier beschriebene säulenchromatographische Trennverfahren geht auf eine von Graefe et al. (1973) entwickelte Methode zurück.

Die Wiederauffindungsquoten für das Isoproterenol und seinen Metaboliten wurde wiederholt mit Hilfe von Proben bestimmt, die bekannte Mengen von ^{3}H-Isoproterenol oder O-Methylisoproterenol enthielten. Da der Metabolit nicht als radioaktiv markierte Substanz zur Verfügung stand, wurde er fluorimetrisch bestimmt (Anregung bei 280 nm, Emission bei 320 nm). Von dem eingesetzten ^{3}H-Isoproterenol wurden 85 bis 94% im Al_2O_3-Eluat wiedergefunden, die Wiederauffindungsquote für O-Methylisoproterenol (Dowex-Eluat) lag zwischen 92 und 96%. Alle Ergebnisse wurden entsprechend korrigiert. Wenn ^{3}H-O-Methylisoproterenol im Inkubationsmedium bestimmt wurde, war es notwendig, eine weitere Korrektur der Ergebnisse vorzunehmen. Die Mengen an ^{3}H-O-Methylisoproterenol, die in das Medium abgegeben wurden, waren nämlich verschwindend gering im Vergleich zu den großen Mengen an ^{3}H-Isoproterenol, die sich im Inkubationsmedium befanden. Die Radioaktivität, die im Dowex-Eluat gefunden wurde, war besonders in diesen Proben nur zum Teil ^{3}H-O-Methylisoproterenol. Der andere Teil repräsentierte Radioaktivität, die erwiesenermaßen vom ^{3}H-Isoproterenol stammte. Versuche mit Testmedien, die ohne Gewebe inkubiert worden waren, haben gezeigt, daß ein gewisser Prozentsatz der Radioaktivität von ^{3}H-Isoproterenol im Dowex-Eluat erschien. Dieser Prozentsatz (er bewegte sich zwischen 2 und 4 %) wurde in allen Versuchen, in denen Inkubationsbäder analysiert wurden, mitbestimmt. Mit Hilfe dieses Prozentsatzes wurde die Radioaktivität korrigiert, die in der ^{3}H-O-Methylisoproterenol-Fraktion gefunden wurde.

Die Summe aus ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol wurde in jeder Probe mit dem Gesamtgehalt der direkt gemessenen Radioaktivität verglichen. Die Summe der Radioaktivität beider Fraktionen lag bei 95 - 105% der Gesamtradioaktivität. Da die Totalaktivität einer Probe mit größerer Genauigkeit bestimmt werden konnte als das ^{3}H-Isoproterenol und sein O-methylierter Metabolit in den beiden Fraktionen der säulenchromatographischen Prozedur, wurden alle Ergebnisse so umgerechnet, daß die Summe aus ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol stets der Gesamtradioaktivität der Probe entsprach.

5. Bestimmung der Radioaktivität

Der ^{3}H- oder ^{14}C-Gehalt der Inkubationsbäder, Gewebsextrakte und Al_2O_3- sowie Dowex-Eluate wurde in einem Flüssigkeitszintillationszähler der Fa. Packard Instruments (Packard Tricarb, Modell 3390/544) gemessen. Zu den in die dafür verwendeten Zählfläschchen einpipettierten oder dort direkt aufgefangenen wässrigen Proben (0.1 bis 2 ml) wurden 8 bis 12 ml eines Szintillator-Cocktails zugesetzt und beides durch kräftiges Schütteln vermengt. Der Szintillator-Cocktail hatte folgende Zusammensetzung (Angaben pro 1.02 l): 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO); 0.1 g Dimethyl-1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol; 600 ml Toluol; 300 ml Triton X 100; 100 ml 98%-iger Äthylalkohol und 20 ml 1 N HCl (Graefe et al., 1973). Die gewählten Impulse pro min (cpm) wurden mit Hilfe des AES (Automatic External Standardisation)-Quotienten und einer Quenchkurve (Zählausbeute in % als Funktion des AES-Quotienten) zu absoluten Zerfallsraten (dpm) hochgerechnet. Die Zählausbeute für ^{3}H schwankte wegen der unterschiedlichen Beschaffenheit der verschiedenen wässrigen Proben (Quencheffekte durch Säuren) zwischen 10 und 25 %. Die Ausbeute für ^{14}C lag zwischen 80 und 85 %.

6. Mathematische Auswertung und Statistik

Alle aufgeführten Mittelwerte sind arithmetische Mittel ($\bar{x}$); die zugehörigen Streuungen sind die mittleren Fehler des Mittelwerts ($S_{\bar{x}}$). Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mit Student's t-Test oder mit dem gepaarten t-Test auf Signifikanz geprüft. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (d.h., $P < 0.05$). Für den statistischen Vergleich von Kurvenverläufen wurde die Varianzanalyse von Winne (1965) herangezogen.

Sättigungsfunktionen wurden nach der Methode von Wilkinson (1961) analysiert. Dabei wurden die experimentellen Daten mit Hilfe eines iterativen Verfahrens durch Minimalisierung der quadratischen Abweichung direkt an die Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt:

$$v_i = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

(v_i = initiale Geschwindigkeit; S = Substratkonzentration; V_{max} = maximale Geschwindigkeit; K_m = Halbsättigungskonstante, d.h. die Substratkonzentration bei der $v_i = V_{max}/2$). Die Analyse nach Wilkinson (1961) liefert K_m und V_{max}-Werte mit den dazugehörenden S_x-Werten. Das bedeutet, daß bei der Rechenprozedur nach Wilkinson (1961) K_m- und V_{max}-Werte nicht auf dem Umweg über eine lineare Transformation der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten werden. Wie die Ergebnisse zeigen, ließ sich die Sättigungsfunktion, die die initiale Geschwindigkeit der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol als Funktion der ^{3}H-Isoproterenolkonzentration darstellt, nicht durch einen einzigen sättigungsfähigen Prozess, sondern nur durch die Summe zweier unterschiedlicher sättigungsfähiger Prozesse beschreiben. Die Ergebnisse wurden deshalb an folgende Gleichung angepaßt:

$$v_i = v_i^1 + v_i^2 = \frac{V_{max}^1 \cdot S}{K_m^1 + S} + \frac{V_{max}^2 \cdot S}{K_m^2 + S}$$

Auch hier wurde die Methode der Minimalisierung der quadratischen Abweichung von Wilkinson (1961) verwendet, um die 4 sättigungskinetischen Konstanten durch Approximation der theoretischen Kurve an die experimentellen Daten zu ermitteln. Dabei wurde eine der beiden Michaelis-Menten-Komponenten mit zunächst präliminären K_m- und V_{max}-Werten von den Ergebnissen subtrahiert und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis die verbleibenden Werte mit kleinster Varianz an eine einfache Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt waren. Die so erhaltenen sättigungskinetischen Konstanten einer Komponente wurden dann von den Originalwerten subtrahiert und die Konstanten der anderen Komponente mit Hilfe der Wilkinson-Methode ermittelt. Auf diese Weise wurden alle 4 Konstanten durch Approximation bestimmt, und es konnte gezeigt werden (s. Abb. 3), daß die mit diesen Konstanten errechnete zusammengesetzte Sättigungsfunktion die Ergebnisse in befriedigender Weise widerspiegelte.

7. Verwendete Substanzen

Cocainhydrochlorid;
Corticosteron (Fluka AG);
3',4'-Dihydroxi-2-methylpropiophenon (U-0521; Upjohn Comp.)
Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA; Merck AG);
3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure (EGTA; Merck AG);
(±)-Isoproterenol-7-^{3}H (N) (4.9-6.3 Ci/mMol; NEN Chemicals);
(±)-Isoproterenolhydrochlorid (Serva);
(±)-Normetanephrinhydrochlorid (Smith, Kline und French);
17-ß-Oestradiol-3-sulfat (Merck AG);
Reserpin (Serpasil^{R}; Ciba Geigy);
D-Sorbit-^{14}C (U) (200 mCi/mMol; NEN Chemicals);
D-Sorbit (Merck AG).

C) Ergebnisse

1. Zeitverlauf der Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol

Die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol wurde bei Aminkonzentrationen im Inkubationsmedium von 0.2 µM und 200 µM untersucht. Hierbei wurden Inkubationszeiten von 0.5 bis 8 min bei 0.2 µM bzw. 0.5 bis 2 min bei 200 µM gewählt (Abb. 1 A und B).

Wie aus Abb. 1 A hervorgeht nahm während der Inkubation mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol die Menge des insgesamt gebildeten ^{3}H-O-Methylisoproterenols linear mit der Inkubationsdauer zu, und zwar für die ganze Beobachtungszeit von 8 min. Die Kurve für die im Gewebe retinierte Metabolitenmenge folgte dem Zeitverlauf der Gesamtproduktion etwa bis zur zweiten min und zeigte danach einen mit zunehmender Inkubationsdauer immer deutlicher werdenden, abknickenden Verlauf. Dieser Befund macht deutlich, daß der ^{3}H-O-Methylisoproterenolgehalt des Gewebes nur während der ersten 2 min der Inkubation den Gesamtumsatz von ^{3}H-Isoproterenol widerspiegelt, da bei länger dauernder Inkubation ständig zunehmende Mengen des O-methylierten Produkts im Inkubationsbad erschienen. Diese Aussage trifft auch für die Versuche mit 200 µM ^{3}H-Isoproterenol zu, denn auch bei dieser Substratkonzentration stieg der Metabolitgehalt des Gewebes während einer zweiminütigen Inkubation linear mit der Zeit an (Abb. 1 B). Die in Abb. 1 B gezeigte lineare Beziehung kann zumindest als indirekter Beweis für die Behauptung angesehen werden, daß auch bei hohen Substratkonzentrationen während der ersten 2 min der Inkubation die Analyse des Gewebes ausreicht, um die Gesamtproduktion von ^{3}H-O-Methylisoproterenol zu erfassen.

Die lineare Abhängigkeit der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol von der Inkubationsdauer und die Tatsache, daß die linearen Zeitverläufe am Ursprung der Zeitachse begannen (wie Extrapolation der Geraden beweist), führten zu dem Schluß, daß die Geschwindigkeit, mit der der Metabolit gebildet wurde, ohne Verzögerung von

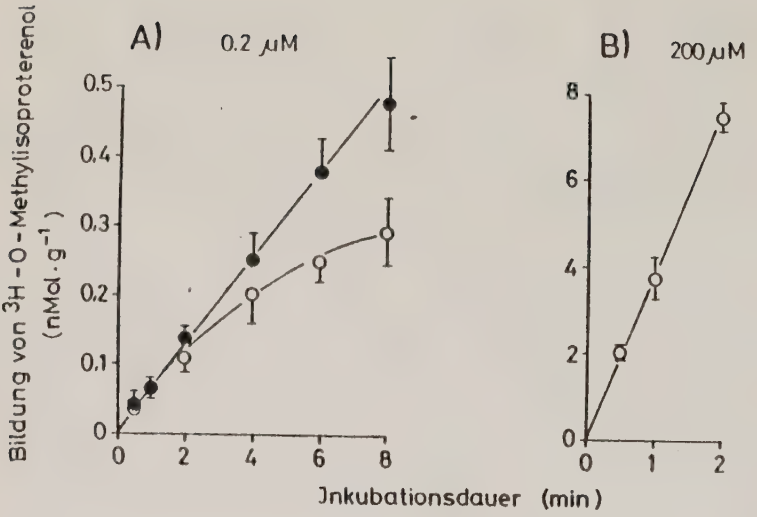


Abb. 1 A und B

Zeitverlauf der Bildung und Retention von ^{3}H-O-Methylisoproterenol im Gewebe; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinaten: Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol (●-●) bzw. Gewebsgehalt an ^{3}H-O-Methylisoproterenol (o-o) in nMol·g^{-1}. Abszissen: Dauer der Inkubation in min. Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte wurden für 0.5 bis 8 min mit 0.2 (A) oder 200 µM (B) ^{3}H-Isoproterenol inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde das gebildete ^{3}H-O-Methylisoproterenol im Gewebe (A und B) und im Inkubationsmedium gemessen (A). Aus der Summe der im Gewebe und im Bad gefundenen Metabolitenmenge ergab sich die insgesamt gebildete Menge an ^{3}H-O-Methylisoproterenol (A; ●-●). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm$ $S_{\bar{x}}$) aus 6 (A) bzw. 9 (B) Versuchen.

Anfang an maximal war und für die Dauer einiger min konstant blieb. Das bedeutet eine extrem schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen der COMT des Gewebes und der Substratkonzentration im Inkubationsmedium. Diese Aussage gilt gleichermaßen für niedrige (0.2 µM) und hohe (200 µM) Substratkonzentrationen. Die Geschwindigkeit der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol, die sich aus den Steigungen der in Abb. 1 A und B dargestellten Geraden ergab, wird im weiteren Verlauf der Arbeit als "initiale" O-Methylierungsgeschwindigkeit bezeichnet.

Zugleich mit der Bestimmung der Metabolitenproduktion wurde die Verteilung von unverändertem ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe untersucht (Abb. 2 A und B). Die Ergebnisse zeigen, daß sich das Amin bei niedrigen Substratkonzentrationen (Abb. 2 A) ausschließlich im Extrazellulärraum verteilte, während bei hohen Aminkonzentrationen im Inkubationsbad (Abb. 2 B) der Verteilungsraum von ^{3}H-Isoproterenol den Extrazellulärraum um ein Vielfaches überstieg. Der Extrazellulärraum (in Abb. 2 A und B als gestrichelte Kurve wiedergegeben) wurde in getrennten Versuchen mit ^{14}C-Sorbit bestimmt. Wenn man berücksichtigt, daß der Zeitverlauf der Verteilung von ^{14}C-Sorbit die Äquilibration der extrazellulären Flüssigkeit des Gewebes mit der Inkubationslösung widerspiegelt (Morgan et al., 1961; Iversen, 1965), lassen sich die Ergebnisse der Abb. 2 folgendermaßen interpretieren: Während bei niedrigen Substratkonzentrationen im Inkubationsmedium unverändertes ^{3}H-Isoproterenol in intrazellulären Verteilungsräumen kaum nachweisbar war, kam es bei hohen Konzentrationen des Amins (zeitabhängig zunehmend) zu einer deutlichen intrazellulären Akkumulation von unverändertem Amin. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß zu einer Zeit, in der die ^{3}H-Isoproterenolkonzentration im Gewebe noch zunahm, die Geschwindigkeit der Metabolitenproduktion schon konstant war (vergl. Abb. 2 B mit Abb. 1 B).

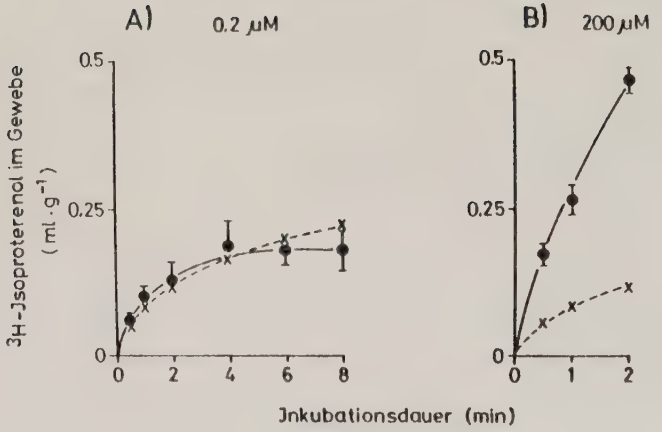


Abb. 2 A und B

Zeitverlauf der Verteilung von unverändertem ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe; Krebs' Lösung; 37°C; Ordinaten: Verteilungsraum für ^{3}H-Isoproterenol (•-•) und ^{14}C-Sorbit (x--x) im Gewebe (in ml·g^{-1}). Abszissen: Dauer der Inkubation in min. Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte wurden für 0.5 bis 8 min mit 0.2 (A) oder 200 µM (B) ^{3}H-Isoproterenol inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde der ^{3}H-Isoproterenolgehalt der Gewebe (nMol·g^{-1}) gemessen und durch die ^{3}H-Isoproterenolkonzentration im Inkubationsbad (nMol·ml^{-1}) geteilt. In einer getrennten Versuchsreihe wurde in gleicher Weise der Zeitverlauf der Verteilung von ^{14}C-Sorbit bestimmt. Die Konzentration von ^{14}C-Sorbit im Inkubationsmedium betrug 0.05 mM. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 6 bis 9 Versuchen (Versuche mit ^{3}H-Isoproterenol) bzw. 26 Versuchen (Versuche mit ^{14}C-Sorbit).

2. Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in Abhängigkeit von der Konzentration des Amins im Inkubationsmedium

In den folgenden Versuchen, in denen die Konzentration des ^{3}H-Isoproterenols im Inkubationsmedium zwischen 0.2 und 300 µM variiert wurde, ist die Dauer der Inkubation auf 1 min festgesetzt worden. Nach Beendigung der Inkubation wurde nur das Gewebe auf ^{3}H-O-Methylisoproterenol und ^{3}H-Isoproterenol untersucht. Gemäß der im letzten Abschnitt (Abschnitt C 1) beschriebenen Ergebnisse ist bei diesem Vorgehen der Metabolitgehalt des Gewebes ein Maß für die initiale O-Methylierungsgeschwindigkeit des angebotenen ^{3}H-Isoproterenols. Die Ergebnisse dieser Versuche bezüglich der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol sind in Abb. 3 zusammengefaßt. Die Auftragung der initialen Bildungsgeschwindigkeit von ^{3}H-O-Methylisoproterenol (v_i) als Funktion der Substratkonzentration im Inkubationsbad (S) ergab eine hyperbole Sättigungskurve (Abb. 3 A), d.h. die Metabolisierungsgeschwindigkeit näherte sich mit steigender Substratkonzentration einem maximalen Wert. Die Frage war nun, ob diese Sättigungsfunktion der einfachen Michaelis-Menten Gleichung gehorcht oder nicht. Wenn dem so wäre, dann sollten alle Punkte der Kurve in Abb. 3 A bei einer doppelt-reziproken Auftragung der Ergebnisse ($1/v_i$ gegen $1/S$; Lineweaver und Burk, 1934) auf einer Geraden liegen. Abb. 3 B zeigt, daß dies nicht der Fall ist. Die einfachste Arbeitshypothese, diesen Befund zu erklären, ist die, daß zwei sättigungsfähige Prozesse mit unterschiedlichen sättigungskinetischen Konstanten nebeneinander existieren und zur O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol beitragen. Die mathematische Analyse (s. Methodik) ergab, daß die Ergebnisse in der Tat an die Summe zweier Michaelis-Menten Gleichungen angepaßt werden können. Die beiden Einzelkomponenten dieser zusammengesetzten Funktion sind in Abb. 3 dargestellt und werden im Folgenden als "niederaffines" und "hochaffines" O-methylierendes System bezeichnet. Die Addition beider Komponenten ergab eine Kurve, die die experimentellen Daten befriedigend beschreibt. Die Kurve, die v_i als Funktion von S

darstellt, kann deshalb durch folgende Gleichung wiedergegeben werden:

$$v_i = \frac{V^1_{max} \cdot S}{K^1_m + S} + \frac{V^2_{max} \cdot S}{K^2_m + S}$$

(wobei V^1_{max} und K^1_m die kinetischen Konstanten des hochaffinen und V^2_{max} und K^1_m die kinetischen Konstanten des niederaffinen Systems bedeuten). Die kinetischen Konstanten der beiden O-methylierenden Systeme sind in Tabelle 1 (Kontrolle) angegeben. Das hochaffine System hat demnach einen niedrigen K_m und eine kleine maximale Umsatzgeschwindigkeit, während das niederaffine System einen relativ hohen K_m und eine relativ große maximale Umsatzgeschwindigkeit hat.

Neben dem ^{3}H-O-Methylisoproterenol enthielt das Drüsengewebe am Ende der 1-minütigen Inkubation auch beträchtliche Mengen an unverändertem ^{3}H-Isoproterenol, und zwar besonders bei hohen Substratkonzentrationen (Abb. 4). Die Aminmengen im Gewebe nahmen praktisch linear mit der ^{3}H-Isoproterenolkonzentration im Inkubationsbad zu, wenn man den Konzentrationsbereich von 5 bis 300 µM berücksichtigt. Da in getrennten Versuchen das extrazelluläre Verteilungsvolumen nach einer 1-minütigen Inkubation mit ^{14}C-Sorbit bestimmt wurde, war es möglich, das in der extrazellulären Flüssigkeit verteilte ^{3}H-Isoproterenol zu berechnen (gestrichelte Linie in Abb. 4). Aus der Differenz zwischen dem extrazellulär verteilten Amin und der insgesamt im Gewebe befindlichen Aminmenge ergab sich die in den Drüsenzellen verteilte Aminmenge. Diese nahm ebenfalls linear mit der Substratkonzentration zu (nicht gezeigt), d.h. in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich war die Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe (nach einer 1-minütigen Inkubation) nicht sättigungsfähig.

Aus der linearen Beziehung zwischen der Akkumulation von unverändertem ^{3}H-Isoproterenol in den Drüsenzellen und der Substratkonzentration müssen allerdings sehr niedrige Substratkonzentrationen ausgeklammert werden. Das ergibt sich zwangsläufig aus den

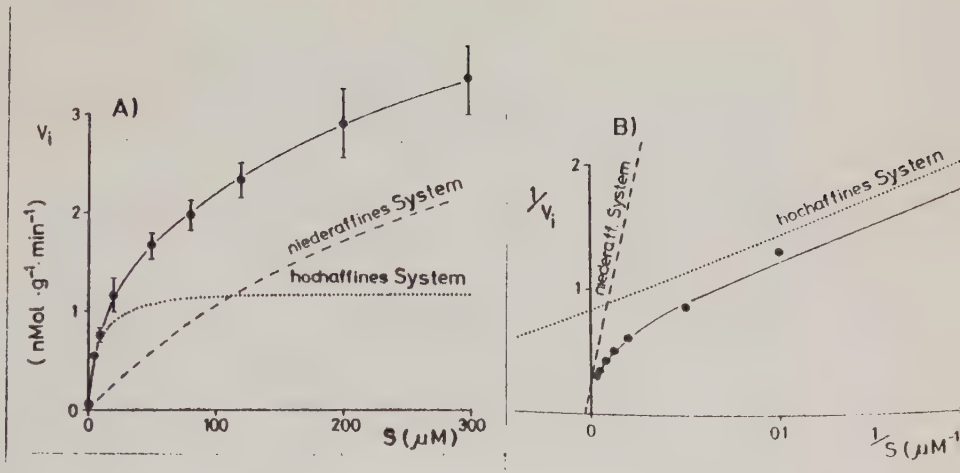


Abb. 3 A und B

Sättigungskinetische Analyse der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in der Submandibulardrüse der Ratte: Krebs' Lösung; 37°C; Ordinaten: v_i = initiale Geschwindigkeit der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol in nMol·g^{-1}·min^{-1} (A); $1/v_i$ (B). Abszissen: S = Substratkonzentration (d.h. Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad) in µM (A); 1/S (B). Gewebsproben der Speicheldrüse wurden für 1 min mit 0.2 bis 300 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert u. am Ende der Inkubation der ^{3}H-O-Methylisoproterenolgehalt des Gewebes gemessen. Die nach 1 min Inkubationsdauer im Gewebe befindl. Menge an ^{3}H-O-Methylisoproterenol ist ein Maß für die initiale Geschwindigkeit, mit der der Metabolit gebildet wird. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm$ S_x) aus 12 Versuchen. Die Analyse der Ergebnisse (s. Methodik und Text) zeigte, daß sich die Kurve der Originalwerte (o-o) als Summenfunktion bestehend aus zwie sättigungsfähigen Prozessen beschreiben läßt. Die sättigungskinetischen Konstanten der beiden Einzelkomponenten (niederaffines u. hochaffines O-methylierendes System) sind in Tab. 1 (Kontrolle) wiedergegeben. Die eingezeichneten Kurven u. Geraden sind mit Hilfe dieser Konstanten berechnet wörden.

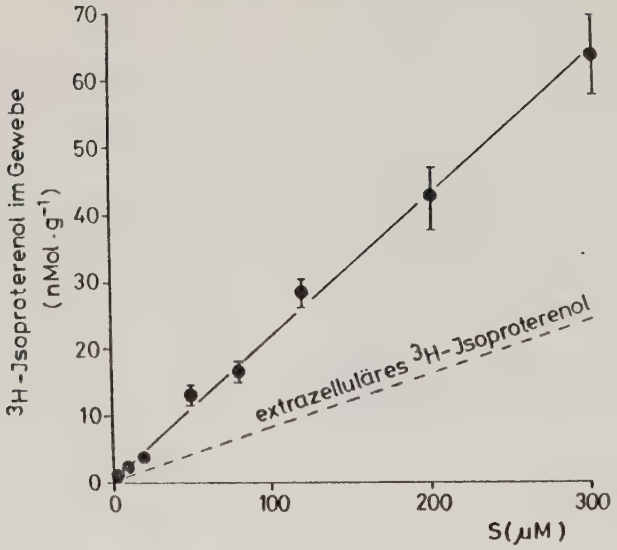


Abb. 4

^{3}H-Isoproterenolgehalt des Drüsengewebes als Funktion der Aminkonzentration im Inkubationsbad; Krebs' Lösung; 37°C; Ordinate: ^{3}H-Isoproterenolgehalt des Gewebes in nMol·g^{-1}; Abszisse: S = Substratkonzentration (d.h. ^{3}H-Isoproterenolkonzentration) im Inkubationsmedium in µM. Gewebsproben der Submandibulardrüse der Ratte wurden für 1 min mit verschiedenen ^{3}H-Isoproterenolkonzentrationen (5 bis 300 µM) inkubiert und der Gehalt des Gewebes an unverändertem Amin gemessen (●-●). In getrennten Versuchen wurde der Verteilungsraum für ^{14}C-Sorbit nach einer 1-minütigen Inkubation mit 0.05 µM ^{14}C-Sorbit bestimmt (0.082 $\pm$ 0.005 ml · g^{-1}; n = 39) und daraus die im ^{14}C-Sorbit-Raum (entspricht dem Extrazellulärraum des Gewebes) verteilte Aminmenge berechnet (---). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm$ $S_{\bar{x}}$) aus 12 Versuchen.

Tabelle 1.

Sättigungskinetische Konstanten für die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in der Submandibulardrüse der Ratte und die Wirkung von Hemmstoffen der extraneuronalen Aminaufnahme

A) hochaffines System

	K_m^1 (µM)	V_{max}^1 ($nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Kontrolle[a)]	7.2 ± 1.1	1.2 ± 0.1
CORT oder NMN[b)]	18.4 ± 1.8	1.1 ± 0.1

B) niederaffines System

	K_m^2 (µM)	V_{max}^2 ($nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Kontrolle[a)]	339 ± 45	4.6 ± 0.4
CORT oder NMN[b)]	822 ± 132	6.5 ± 1.0

Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$); die Berechnung der K_m- und V_{max}-Werte basiert auf der von Wilkinson (1961) beschriebenen Rechenmethode (s. Methodik).

a) Gewebsproben wurden unter Kontrollbedingungen inkubiert (Abb. 3)

b) Gewebsproben wurden in Gegenwart von 30 µM Corticosteron (CORT) oder 30 µM Normetanephrin (NMN) inkubiert (Abb. 8 und 9); Die Ergebnisse beider experimenteller Gruppen wurden gemittelt.

in Abschnitt C 1 besprochenen Versuchsergebnissen, nämlich aus der Beobachtung, daß bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen (0.2 µM) kaum unverändertes ^{3}H-Isoproterenol in den Zellen nachweisbar war. Aus den in Abb. 4 gezeigten Ergebnissen kann man (durch Extrapolation der linearen Funktionen gegen 0.2 µM) berechnen, daß bei einer Substratkonzentration von 0.2 µM 32.5 pMol·g^{-1} intrazellulär akkumuliertes ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe vorhanden sein müßte. In zahlreichen Versuchen, in denen der ^{3}H-Isoproterenolgehalt des Drüsengewebes nach einer 1-minütigen Inkubation gemessen wurde (n = 40; es handelt sich um Kontrollversuche einer Versuchsgruppe, die im Abschnitt C 3 besprochen wird), fanden sich aber (nach Korrektur mit dem Extrazellulärraum) nur 7.7 pMol pro g Gewebe. Ein Vergleich der beiden Zahlen zeigt, daß bei einer Konzentration von 0.2 µM viel weniger ^{3}H-Isoproterenol in den Drüsenzellen akkumulierte als man von den Ergebnissen in Abb. 4 erwarten würde. Da die COMT ein intrazellulär lokalisiertes Enzym ist (Übersicht bei Guldberg und Marsden, 1975), wäre es durchaus denkbar, daß die COMT, die für das hochaffine O-methylierende System verantwortlich ist, bei niedrigen Substratkonzentrationen den größten Teil des aufgenommenen ^{3}H-Isoproterenols metabolisiert, so daß es kaum zur Akkumulation von unverändertem Amin in den Zellen kommt. Um mehr Information über die Beziehung zwischen zellulärer Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol zu erhalten, wurde in den folgenden Versuchen unter anderem der Einfluß von Hemmstoffen der extraneuronalen Aufnahme auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol untersucht.

3. Der Einfluß verschiedener Hemmstoffe und einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung auf die Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol

a) Versuche mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol

In dieser Serie von Versuchen wurden Gewebsproben der Speicheldrüse für 1 min mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert und am Ende der

Versuche der Gehalt des Gewebes an ^{3}H-Isoproterenol und ^{3}H-O-Methylisoproterenol bestimmt. In gepaarten Versuchen sollte geprüft werden, welchen Einfluß verschiedene Substanzen unter diesen Versuchsbedingungen auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol haben. Dabei wurden mehrere Gewebsproben einer Drüse in parallelen Ansätzen nebeneinander inkubiert, und zwar jeweils eine ohne Hemmstoffe (Kontrolle) und die anderen in Gegenwart der zu testenden Substanzen. Die Kontrollversuche (n = 40) ergaben einen ^{3}H-O-Methylisoproterenolgehalt des Gewebes von 47.9 ± 4.0 pMol·g^{-1} und einen ^{3}H-Isoproterenolgehalt von 24.1 ± 1.3 pMol·g^{-1}. Mit Hilfe der in Tabelle 1 angegebenen sättigungskinetischen Konstanten kann man berechnen, daß bei einer Substratkonzentration von 0.2 µM das hochaffine O-methylierende System für mehr als 90% der beobachteten Gesamtproduktion des Metaboliten verantwortlich ist. Außerdem ergibt sich aus dem nach einer 1-minütigen Inkubation bestimmten ^{14}C-Sorbit-Raum (0.082 ± 0.005 ml·g^{-1}; n = 39), daß etwa 70% des im Gewebe befindlichen ^{3}H-Isoproterenols extrazellulär verteilt sind.

Unter diesen experimentellen Bedingungen hatte weder 17 mM Äthylalkohol (der als Lösungsvermittler für verschiedene Substanzen verwendet wurde; s. Methodik), noch 30 µM Cocain (ein selektiver Hemmstoff der neuronalen Aufnahme; Iversen, 1963) einen hemmenden Einfluß auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol (Abb. 5 A). Die hier verwendete Konzentration von Cocain ist relativ hoch, wenn man berücksichtigt, daß Cocain ein potenter Hemmstoff der neuronalen Aufnahme ist (ED_{50} bei niedrigen Substratkonzentrationen 0.4 - 1.0 µM; Iversen, 1967; Graefe et al., 1978). Im Gegensatz zu der Beobachtung, die mit Cocain gemacht wurde, beeinträchtigten Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol deutlich (Abb. 5 A). Das gilt gleichermaßen für Normetanephrin und Phenoxybenzamin (Iversen, 1965), als auch für Corticosteron und 17-ß-Oestradiol (Iversen und Salt, 1970), die alle in einer Konzentration von 30 µM getestet wurden. Die Ergebnisse zeigen (s. Abb. 5 A), daß Normetanephrin und die beiden Corticosteroide als Hemmstoffe

etwa gleich wirksam waren, während Phenoxybenzamin die Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol wesentlich deutlicher verminderte. Der Hemmstoff der COMT, U-0521 (Giles und Miller, 1967), reduzierte die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 5 A); die Konzentration von U-0521, die eine 50%ige Hemmung verursachte, lag bei etwa 1 µM.

In der gleichen Versuchsserie wurde auch geprüft, ob eine Erniedrigung der Na^{+}-Konzentration in der Inkubationslösung einen Einfluß auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol hat. Aus Untersuchungen von Gillespie und Towart (1973) ist bekannt, daß eine Erniedrigung der externen Na^{+}-Konzentration von 114 auf 25 mM die extraneuronale Akkumulation von Noradrenalin in glatten Gefäßmuskelzellen um etwa 25 % vermindert. Eine derartige Veränderung der extrazellulären Na^{+}-Konzentration hatte aber keinen Einfluß auf die Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol in der Submandibulardrüse der Ratte (Major, 1979). Das Drüsengewebe wurde deshalb mit einer Lösung inkubiert, in der die Na^{+}-Konzentration von 143 auf 25 mM reduziert wurde, wobei zur Aufrechterhaltung der Osmolarität der Lösung 118 mM NaCl durch 236 mM Saccharose ersetzt wurden. Wie aus Abb. 5 A hervorgeht, wurde ^{3}H-O-Methylisoproterenol unter diesen Bedingungen mit der gleichen Geschwindigkeit gebildet wie unter Kontrollbedingungen; d.h. ein partieller Na^{+}-Mangel im Inkubationsmedium hatte keinen Einfluß auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol. Wenn aber 118 mM NaCl durch 118 mM KCl ersetzt wurden (d.h. wenn die K^{+}-Konzentration der Lösung von 5.9 auf 123.8 erhöht wurde), kam es zu einer etwa 50%-igen Hemmung der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol (Abb. 5 A). In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß die extraneuronale Aufnahme und Akkumulation von Katecholaminen durch hohe, die Zellmembran depolarisierende K^{+}-Konzentrationen gehemmt wird (Gillespie und Towart, 1973; Anning et al., 1978; Major, 1979).

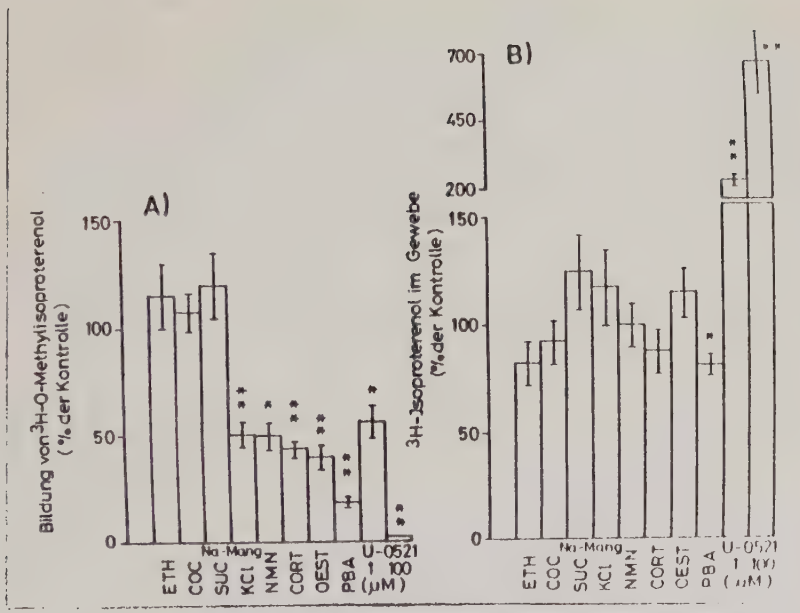


Abb. 5 A und B

Einfluß verschiedener Hemmstoffe oder einer veränderten Ionenzusammensetzung der Inkubationslösung auf die Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol; Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C; Höhe der Säulen: Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol in % der Kontrolle (A) und ^{3}H-Isoproterenolgehalt des Gewebes in % der Kontrolle (B). Gewebsproben der Speicheldrüsen wurden für 1 min mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert und zwar in gepaarten Versuchen entweder ohne oder mit dem Hemmstoff im Inkubationsmedium. Folgende Substanzen wurden verwendet: ETH (absoluter Äthylalkohol; 17 mM; als Lösungsvermittler für CORT, OEST und PBA verwendet); COC (Cocain; 30 µM); NMN (Normetanephrin; 30 µM); CORT (Corticosteron; 30 µM); OEST (17-β-Oestradiol; 30 µM); PBA (Phenoxybenzamin; 30 µM); U-0521 (3',4'-Dihydroxi-2-methylpropiophenon, ein Hemmstoff der COMT; 1 µM oder 100 µM). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Na^+-Konzentration von 143 auf 25 mM erniedrigt (Na-Mang.). Zu diesem Zweck wurden 118 mM NaCl entweder durch 236 mM Saccharose (SUC) oder 118 mM KCl (KCL) ersetzt, um die Osmolarität des Mediums konstant zu halten. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_x$) aus mindestens 6 Ver-

In den Versuchen, deren Ergebnisse in Abb. 5 A zusammengefaßt sind, wurde neben der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol auch der Gehalt des Gewebes an ^{3}H-Isoproterenol gemessen (Abb. 5 B). Unter den zahlreichen verschiedenen Versuchsbedingungen, die hier untersucht wurden, führte nur die Hemmung der COMT durch U-0521 zu einer Steigerung des ^{3}H-Isoproterenolgehalts im Gewebe. Auch eine etwa 50%-ige Hemmung der O-Methylierung durch 1 µM U-0521 (Abb. 5 A) hatte eine signifikante Zunahme des Gewebsgehalts an unverändertem ^{3}H-Isoproterenol zur Folge. Diese Beobachtung muß besonders deshalb hervorgehoben werden, weil eine in ihrem Ausmaß etwa vergleichbare Verminderung der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol, die in Gegenwart der hohen K^{+}-Konzentration oder nach Zugabe der Hemmstoffe Normetanephrin, Corticosteron und 17-ß-Oestradiol gefunden wurde, keine entsprechende Steigerung im ^{3}H-Isoproterenolgehalt nach sich zog. Es ist deshalb berechtigt anzunehmen, daß die Beeinträchtigungen der Metabolitproduktion durch die Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme (und durch K^{+}-Überschuß) nicht auf eine Hemmung der COMT, sondern auf eine Blockade der zellulären Aufnahme des Substrats zurückgehen. Die Tatsache, daß unter diesen Bedingungen keine Reduktion des im Gewebe verteilten ^{3}H-Isoproterenols beobachtet wurde (einzige Ausnahme Phenoxybenzamin; s. Abb. 5 B) läßt sich damit erklären, daß der im Extrazellulärraum befindliche Anteil des Amins mit etwa 70 % (s. oben) so groß war, daß

---

suchen für jede Säule. In den Kontrollversuchen (n = 40) betrug der ^{3}H-O-Methylisoproterenolgehalt der Gewebe 47.9 $\pm$ 4.0 pMol·g^{-1}, während der ^{3}H-Isoproterenolgehalt bei 24.1 $\pm$ 1.3 pMol·g^{-1} lag (der letzte Wert schließt die extrazellulär verteilte Aminmenge ein, welche 16.4 pMol·g^{-1} ausmachte).
Die Sternchen oberhalb der Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen (gepaarter t-Test): *P < 0.01; **P < 0.001.

es nicht möglich war, die Hemmung der Aminakkumulation exakt zu erfassen. In diesem Zusammenhang erscheint es wichtig darauf hinzuweisen, daß die in Gegenwart von 100 µM U-0521 im Gewebe akkumulierte Menge an ^{3}H-Isoproterenol der Menge an Totalradioaktivität (Amin plus Metabolit) entsprach, die in den Kontrollgeweben (ohne U-0521 inkubiert) gefunden wurde. Die mit 100 µM U-0521 inkubierten Gewebe hatten einen ^{3}H-Isoproterenolgehalt, der 110.0 $\pm$ 12.7 % (n = 6) des ^{3}H-Gehalts der Kontrollgewebe ausmachte. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß U-0521 in der verwendeten Konzentration die zelluläre Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol nicht beeinträchtigte.

Die in den Versuchen mit K^+-Überschuß im Inkubationsmedium verwendete K^+-Konzentration ist mit 123.9 mM sehr hoch. Man kann wohl mit Recht annehmen, daß diese K^+-Konzentration nicht nur die Plasmamembran der Drüsenzellen, sondern auch die axonale Membran sympathischer Nervenendigungen depolarisiert, d.h. deren Ruhemembranpotential erheblich vermindert. Da depolarisierende K^+-Konzentrationen endogenes Noradrenalin aus den sympathischen Terminalfasern freisetzen (Kirpekar und Wakade, 1968; Haeusler et al., 1968), muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß das freigesetzte Noradrenalin die extraneuronale Aufnahme und nachfolgende O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol kompetitiv hemmt. Die in Abb. 5 A gezeigte Hemmung der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol durch K^+-Überschuß könnte demnach durch Konkurrenz zwischen dem freigesetzten Noradrenalin und ^{3}H-Isoproterenol an den Aufnahmestellen der Drüsenzellmembran zustande kommen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol (0.2 µM; Inkubation für 1 min) unter Bedingungen gemessen, unter denen eine Freisetzung von endogenem Noradrenalin nicht möglich ist (Abb. 6). In einer Versuchsgruppe wurden die endogenen Noradrenalinspeicher durch Vorbehandlung der Tiere mit Reserpin (s. Methodik) entleert und in einer weiteren Gruppe von Versuchen wurde die Freisetzung von Noradrenalin durch Verwendung einer Ca^{++}-freien Lösung (die zusätzlich 1 mM EGTA enthielt, um noch vorhandene Ca^{++}-Ionen abzufangen) unmöglich gemacht. Es ist nämlich bekannt, daß die durch Depola-

risation der Nervenendigungen bedingte Transmitterfreisetzung nur in Anwesenheit von Ca^{++} im Extrazellulärraum möglich ist (Kirpekar und Wakade, 1968; Haeusler et al., 1968). Abb. 6 illustriert, daß die hemmende Wirkung hoher K^{+}-Konzentrationen auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol unter diesen Bedingungen unverändert nachweisbar war. Die Hypothese, daß die hemmenden Effekte K^{+}-reicher Lösungen durch eine Freisetzung endogenen Noradrenalins zustande kommen, muß deshalb vorworfen werden. Abb. 6 zeigt außerdem, daß in Ca^{++}-freier Lösung weniger ^{3}H-Isoproterenol O-methyliert wird als unter Kontrollbedingungen. Dieser Effekt könnte einerseits durch den Ca^{++}-Mangel bedingt sein und/oder andererseits auf die Anwesenheit von EGTA in der Inkubationslösung zurückgehen.

Die Empfindlichkeit der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol gegenüber Corticosteroiden wurde in den Versuchen von Abb. 5 unter experimentellen Bedingungen geprüft, die eine 15-minütige Vorinkubation der Gewebsproben mit den Hemmstoffen einschlossen. Untersuchungen von Salt (1972) am perfundierten Rattenherzen haben gezeigt, daß der Hemmeffekt von 17-ß-Oestradiol auf die extraneuronale Akkumulation von ^{3}H-Noradrenalin mit der Dauer der Vorperfusion der Herzen mit dem Hemmstoff zunimmt; die inhibitorische Wirkung von 17-ß-Oestradiol war unter den Versuchsbedingungen von Salt (1972) nach einer 15-minütigen Vorinkubation am stärksten. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kam auch Bönisch (1978), der Corticosteron als Inhibitor der Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol am Rattenherzen untersuchte. An der Submandibulardrüse der Ratte ließ sich ein Einfluß der Dauer der Vorinkubation auf die Hemmwirkung von 17-ß-Oestradiol (30 µM) ebenfalls nachweisen (Abb. 7). Die Dauer der Vorinkubation mit dem Inhibitor betrug 5 oder 30 min, ehe die Gewebsproben mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol in Gegenwart des Inhibitors inkubiert wurden; gemessen wurde die Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol nach 1-minütiger Inkubation. Der Hemmeffekt von 17-ß-Oestradiol war bei den Gewebsproben, die 30 min mit dem Hemmstoff vorinkubiert waren, wesentlich stärker als bei den Gewebsproben, die vorher

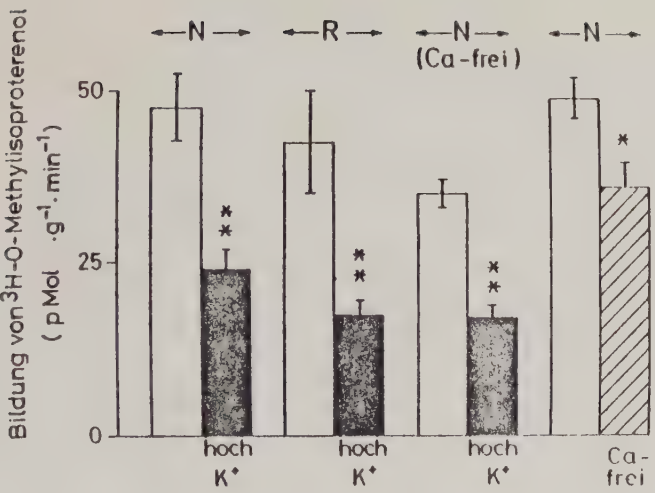


Abb. 6

Der Einfluß einer hohen K^+-Konzentration auf die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol unter verschiedenen experimentellen Bedingungen; Submandibulardrüse der Ratte; 37°C. Höhe der Säulen: Bildungsgeschwindigkeit von ^{3}H-O-Methylisoproterenol in nMol·g^{-1}·min^{-1}. Gewebsproben von unbehandelten (N) oder von mit Reserpin behandelten Tieren (R) wurden für 1 min mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert und zwar entweder in normaler Krebs' Lösung (weiße Säulen) oder in einer Krebs' Lösung, in der 118 mM NaCl durch 118 mM KCl ersetzt wurden (schwarze Säulen; Endkonzentration für K^+ = 123.5 mM). Eine der Versuchsgruppen wurde mit Ca^{++}-freier Krebs' Lösung (Ca-frei) durchgeführt, die außerdem 1 mM EGTA enthielt. In dem rechts außen gezeigten Säulenpaar wurde getestet, ob Ca^{++}-freie Krebs' Lösung per se die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol beeinflußt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus jeweils 5 gepaarten Versuchen. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle (gepaarter t-Test): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

nur 5 min mit dem Hemmstoff in Kontakt waren. Einen solchen Einfluß der Vorinkubationsdauer auf die Hemmung der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol wurde für die Inhibitoren Normetanephrin (30 µM) und Phenoxybenzamin (30 µM) nicht beobachtet (Abb. 7).

b) Versuche mit hohen ^{3}H-Isoproterenolkonzentrationen

Die inhibitorischen Wirkungen von Corticosteron und Normetanephrin (jeweils 30 µM) wurden auch bei Substratkonzentrationen untersucht, bei denen das niederaffine O-methylierende System mehr und mehr zur Metabolisierung von ^{3}H-Isoproterenol beiträgt. Die Substratkonzentrationen lagen bei diesen Versuchen zwischen 5 und 300 µM. Wie Abb. 8 zeigt, nahm die durch die Inhibitoren bedingte Hemmung der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol (beide Inhibitoren waren etwa gleich stark wirksam) mit steigenden Substratkonzentrationen sichtlich ab. - Während die Metabolitproduktion bei 5 µM ^{3}H-Isoproterenol durch beide Inhibitoren um 57 - 64 % gehemmt wurde, belief sich die Hemmung bei 300 µM ^{3}H-Isoproterenol nur noch auf 17 - 19 % (s. Abb. 8). Solche Ergebnisse wären zu erwarten, wenn Normetanephrin und Corticosteron die Metabolitbildung in beiden O-methylierenden Systemen kompetitiv hemmen würden. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die Sättigungskurven der Abb. 8, die in Gegenwart von Normetanephrin und Corticosteron erstellt worden sind, kinetisch analysiert. Die Analyse der Einzelkurven stieß wegen der relativ großen Streuung der Ergebnisse auf Schwierigkeiten. Da aber zwischen den beiden Einzelkurven varianzanalytisch kein Unterschied bestand (Varianzanalyse nach Winne, 1965; $F_{8,80} = 0.571$; $P > 0.05$), wurden die Ergebnisse der Versuche mit Normetanephrin und Corticosteron arithmetisch gemittelt. Die so erhaltenen Mittelwerte wurden nach Lineweaver und Burk (1934) aufgetragen (Abb. 9). Wie bei der Sättigungsfunktion für die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol unter Kontrollbedingungen (Abb. 3) wurde auch in Abb. 9 keine einfache lineare Beziehung zwischen $1/v_i$ und $1/S$ erhalten, d.h. auch nach partieller Hemmung der extraneuronalen Aufnahme durch Normetanephrin oder Corticosteron waren die zwei O-methylierenden Systeme

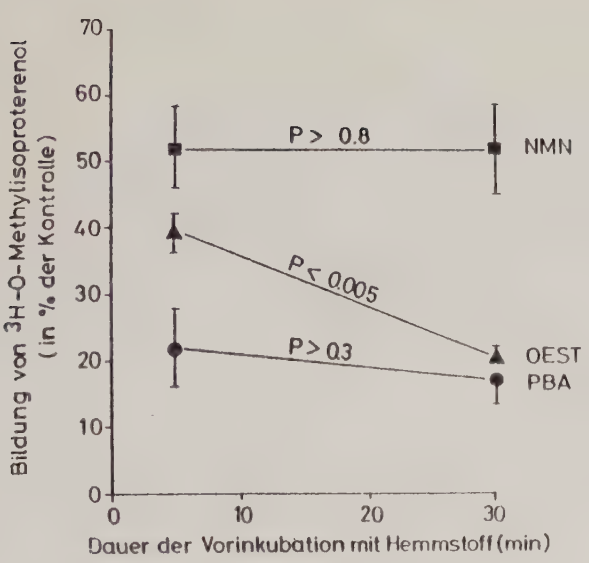


Abb. 7

Einfluß der Dauer der Vorinkubation auf die Wirkung verschiedener Hemmstoffe der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol; Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: Bildungsgeschwindigkeit für ^{3}H-O-Methylisoproterenol in % der Kontrolle. Abszisse: Dauer der Vorinkubation mit dem Hemmstoff (NMN = Normetanephrin; OEST = 17-β-Oestradiol; PBA = Phenoxybenzamin) in min. Gewebsproben der Speicheldrüse wurden für 1 min mit 0.2 µM ^{3}H-Isoproterenol inkubiert. Die Inkubation mit dem Amin erfolgte entweder ohne (Kontrolle) oder mit 30 µM NMN, OEST oder PBA. Vor der Inkubation mit ^{3}H-Isoproterenol wurden alle Gewebe 30 min lang mit Krebs' Lösung äquilibriert (Vorinkubation). Die Hemmstoffe wurden schon während der Vorinkubation dem Medium zugesetzt, und zwar entweder während der letzten 5 min der Vorinkubation oder während der ganzen Vorinkubation. Gezeigt sind Mittelwerte ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus mindestens 5 Versuchen pro Symbol. Die P Werte wurden aus dem gepaarten t-Test erhalten. In den Kontrollgeweben betrug die Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol 45.6 $\pm$ 9.2 pMol·g^{-1}·min^{-1} (n = 5).

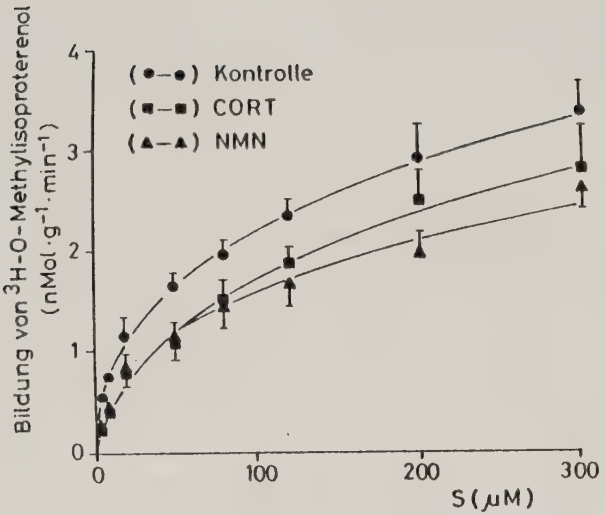


Abb. 8

Einfluß von Corticosteron (CORT) oder Normetanephrin (NMN) auf die Sättigungskinetik der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol; Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: initiale Geschwindigkeit der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol in nMol·g^{-1}·min^{-1}. Abszisse: S = Konzentration von ^{3}H-Isoproterenol im Inkubationsbad in µM. Gewebsproben der Speicheldrüse wurden für 1 min mit verschiedenen ^{3}H-Isoproterenolkonzentrationen (5 bis 300 µM) inkubiert und danach der ^{3}H-O-Methylisoproterenolgehalt der Gewebe bestimmt. Die Inkubation erfolgte entweder ohne (Kontrolle) oder mit 30 µM CORT oder NMN im Inkubationsbad. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm s_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen pro Symbol. Die Kurve, die nach Inkubation in Gegenwart von CORT erhalten wurde, unterscheidet sich varianzanalytisch nicht von der, die sich aus den Versuchen mit NMN ergab (Varianzanalyse nach Winne; $F_{8,80} = 0.571$; $P > 0.05$).

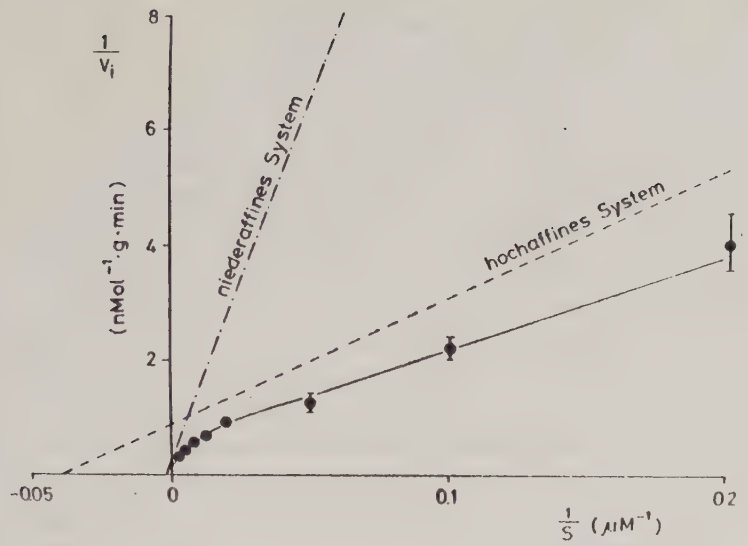


Abb. 9

Sättigungskinetische Analyse der O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol nach partieller Hemmung der extraneuronalen Aufnahme durch 30 µM Normetanephrin oder 30 µM Corticosteron: Submandibulardrüse der Ratte; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: $1/v_j$ = reziproke initiale Geschwindigkeit der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol in $nMol^{-1} \cdot g \cdot min$. Abszisse: 1/S = reziproke ^{3}H-Isoproterenolkonzentration im Inkubationsbad in μM^{-1}. Es handelt sich um die gleichen Versuche, die in Abb. 8 gezeigt sind. Die Ergebnisse, die in den Versuchen mit Corticosteron und Normetanephrin erhalten wurden, wurden arithmetisch gemittelt, da zwischen beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied bestand (s. Legende zu Abb. 8). Das Bild zeigt, daß es sich bei der Sättigungsfunktion nach partieller Hemmung der O-Methylierung durch Corticosteron oder Normetanephrin nicht um einen singulären sättigungsfähigen Prozess, sondern um die Summe zweier sättigungsfähiger Komponenten handelt (Vergleiche mit Abb. 3 B). Die sättigungskinetischen Konstanten, die sich für beide Systeme errechnen ließen, sind in Tabelle 1(s. S. 7 gezeigt (CORT oder NMN).

nachweisbar, die unter Kontrollbedingungen gefunden wurden. Die sättigungskinetischen Konstanten, die sich aus diesen Ergebnissen für beide Systeme ergaben (Tabelle 1; CORT oder NMN) unterscheiden sich von den Konstanten der Kontrollversuche nur bezüglich der K_m-Werte (s. Tabelle 1; V^2_{max}-Kontrolle gegen V^2_{max}-CORT/NMN; $P > 0.05$). Der K_m für das hochaffine System wurde durch die Hemmstoffe um den Faktor 2.6 erhöht, und der K_m für das niederaffine System nahm um den Faktor 2.4 zu; d.h. beide K_m-Werte wurden etwa um den selben Faktor gesteigert. Diese Beobachtungen zeigen, daß 1) Normetanephrin und Corticosteron die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol in beiden Systemen kompetitiv hemmen und daß 2) Normetanephrin und Corticosteron die Funktion beider Systeme etwa gleich stark beeinträchtigen. Nach Umformung der den kompetitiven Hemmungstyp charakterisierenden Beziehung zwischen K_m' (K_m in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors) und K_m (K_m unter Kontrollbedingungen),

$$K_m' = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i} \right)$$

(wobei I = Inhibitorkonzentration, K_i = Inhibitor- oder Affinitätskonstante des Inhibitors; Segel, 1976), erhält man die einfache Gleichung

$$K_i = \frac{K_m \cdot I}{K_m' - K_m} = \frac{I}{K_m'/K_m - 1} ,$$

mit deren Hilfe die Inhibitorkonstante K_i ermittelt werden kann (K_m- und K_m'-Werte s. Tabelle 1; I = 30 µM). Der K_i von Corticosteron und Normetanephrin bezüglich der Hemmung des hochaffinen O-methylierenden Systems betrug 19 µM und war praktisch identisch mit dem K_i-Wert der Hemmstoffe für das niederaffine System (21 µM).

Wie bereits in Abschnitt 1 und 2 der Ergebnisse besprochen, akkumulierte bei hohen Substratkonzentrationen der größte Teil des aufgenommenen ^{3}H-Isoproterenols in den Drüsenzellen und wurde nicht metabolisiert (s. Abb. 4). Wie zu erwarten, wurde

auch diese intrazelluläre Akkumulation des Amins durch Corticosteron und Normetanephrin (jeweils 30 µM) gehemmt (Abb. 10). Wenn man die Ergebnisse bei allen untersuchten Substratkonzentrationen als Ganzes betrachtet, ergibt sich sowohl zwischen den Ergebnissen der Normetanephrin- und der Kontroll-Gruppe ($F_{8,80} = 2.488$; $P < 0.05$), als auch zwischen den Ergebnissen der Corticosteron- und der Kontroll-Gruppe ($F_{8,80} = 6.249$; $P < 0.01$) varianzanalytisch (Winne, 1965) ein signifikanter Unterschied.

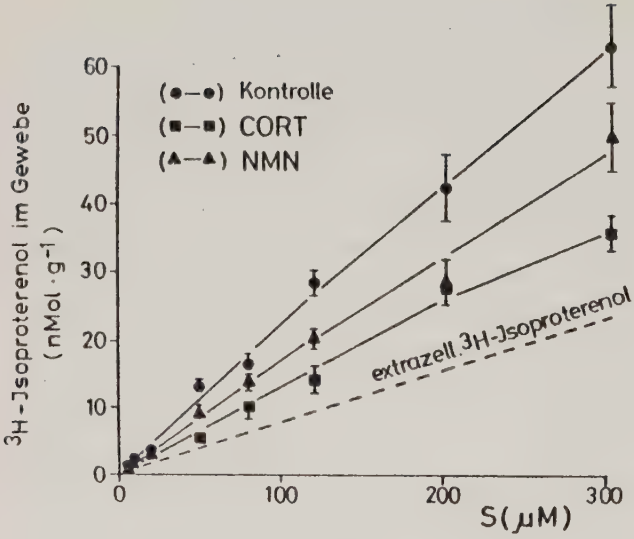


Abb. 10

Der Einfluß von Corticosteron (CORT) oder Normetanephrin (NMN) auf den ^{3}H-Isoproterenolgehalt des Drüsengewebes nach Inkubation mit verschiedenen Aminkonzentrationen; Krebs' Lösung; 37°C. Ordinate: ^{3}H-Isoproterenolgehalt des Gewebes in mMol·g^{-1}. Abszisse: S = ^{3}H-Isoproterenolkonzentration im Inkubationsbad in µM. Gewebsproben wurden 1 min lang mit verschiedenen ^{3}H-Isoproterenolkonzentrationen (5 bis 300 µM) inkubiert und der Gehalt des Gewebes an unverändertem Amin gemessen. Die Versuche wurden entweder ohne (Kontrolle) oder mit 30 µM CORT (oder NMN) im Inkubationsbad durchgeführt. In getrennten Versuchen wurde der Verteilungsraum für ^{14}C-Sorbit nach einer 1-minütigen Inkubation mit 0.05 µM ^{14}C-Sorbit bestimmt (0.082 $\pm$ 0.005 ml·g^{-1}; n = 39) und daraus die im ^{14}C-Sorbit-Raum (d.h. im Extrazellulärraum des Gewebes) verteilte Aminmenge berechnet (---). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm$ $S_{\bar{x}}$) aus mindestens 6 Versuchen. Der hemmende Einfluß von Corticosteron ($F_{8,80}$ = 6.249; P < 0.01) und Normetanephrin ($F_{8,80}$ = 2.488; P < 0.05) auf die Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe ist statistisch signifikant (Varianzanalyse nach Winne, 1965).

D) Diskussion der Ergebnisse

Die Aufnahme von Noradrenalin in extraneuronale Strukturen der Submandibulardrüse der Ratte wurde erstmals von Andén et al. (1963) beschrieben und später von Fischer et al. (1965) bestätigt. Histochemische Untersuchungen von Hamberger et al. (1967) haben gezeigt, daß es sich bei diesen extraneuronalen Strukturen hauptsächlich um Drüsenzellen handelt. Wie in vielen anderen Organen (s. Einleitung) wird in der Speicheldrüse unter gewissen experimentellen Bedingungen ein großer Prozentsatz des extraneuronal aufgenommenen Noradrenalins zu Normetanephrin O-methyliert (Andén et al., 1963; Almgren und Jonason, 1971). Auch die O-Methylierung von Noradrenalin findet hauptsächlich in den Drüsenzellen des Organs statt. Wenn man nämlich den Hauptausführungsgang der Submandibulardrüse unterbindet, kommt es zu einer selektiven Atrophie des parenchymatösen Anteils des Organs (Standish und Shafer, 1975). In solchen atrophierten Drüsen ist eine extraneuronale Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Noradrenalin kaum noch nachweisbar (Almgren und Jonason, 1971) und die COMT-Aktivität des Gewebes im Vergleich zu Kontrolldrüsen sehr niedrig (Jonason, 1969; Guldberg und Marsden, 1975). Weitere Untersuchungen haben deutlich gemacht, daß die Aufnahme von Katecholaminen in das Parenchym der Speicheldrüse nicht nur bezüglich ihrer Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen (Almgren und Jonason, 1975, 1976), sondern auch bezüglich ihrer sättigungskinetischen Eigenschaften (Major, 1979) als zellulärer Aufnahmemechanismus charakterisiert werden kann, der praktisch identisch ist mit der extraneuronalen Aufnahme von Katecholaminen in Gewebe mesenchymaler Herkunft (Herzgewebe: Übersichten bei Iversen, 1975 und Trendelenburg, 1976; glatte Gefäßmuskulatur: Übersicht bei Gillespie, 1976).

Erst auf Grund neuerer Untersuchungen weiß man, daß die O-Methylierung von Katecholaminen in intakten Geweben der Michaelis-Menten Kinetik gehorcht und sättigungsfähig ist (Literatur s. Einleitung). Da die Bildung von O-metylierten Metaboliten aus Noradrenalin in allen bisher untersuchten Organen (nicht nur

durch Hemmstoffe der COMT, sondern auch durch Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme gehemmt werden kann und die Metabolisierung deshalb als Folgereaktion der extraneuronalen Aufnahme aufgefaßt werden muß, hat man den Begriff des O-methylierenden Kompartiments (Bönisch et al., 1974) oder Systems (Fiebig und Trendelenburg, 1978 b) geprägt. Alle bisher gemachten Untersuchungen haben gezeigt, daß der K_m-Wert für die O-Methylierung von Noradrenalin im intakten Gewebe unterhalb von 10 µM liegt und damit wesentlich kleiner ist als der K_m-Wert der extraneuronalen Aufnahme (60 - 500 µM; Zusammenstellung bei Major, 1979). Demnach stellt das "O-methylierende System" einen extraneuronalen Inaktivierungsmechanismus dar, durch den Katecholamine mit relativ hoher Affinität irreversibel (d.h. durch Metabolisierung) inaktiviert werden können. Die Bedeutung eines solchen Systems liegt in der Irreversibilität der Inaktivierung, denn durch die der Aufnahme nachgeschaltete COMT können Katecholamine zeitlich unbegrenzt aus der extrazellulären Flüssigkeit eliminiert werden. Die extraneuronale Aufnahme allein (ohne die katabolische Folgereaktion) würde lediglich zu einer zeitlich begrenzten, reversiblen Inaktivierung extrazellulären Noradrenalins oder Adrenalins führen können. Auf die mögliche physiologische Bedeutung des extraneuronalen O-methylierenden Systems wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (s. auch unten).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik der O-Methylierung eines Katecholamins in der Submandibulardrüse der Ratte untersucht. Die Frage, die es zu beantworten galt, war, ob das Drüsengewebe auch bezüglich der O-Methylierung mit anderen Organen vergleichbar ist oder nicht. Als Modellsubstrat wurde ^{3}H-Isoproterenol verwendet. Die Vorteile, die dieses Katecholamin (ein N-Isopropyl-Derivat des Noradrenalins) bietet, wurden bereits in der Einleitung genannt.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit liegt in der Beobachtung, daß in der Speicheldrüse der Ratte die O-Methylierung von ^{3}H-

Isoproterenol schon in einem relativ niedrigen Konzentrationsbereich sättigungsfähig war und der Michaelis-Menten Kinetik gehorchte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die an der Nickhaut der Katze erhoben wurden (Graefe und Trendelenburg, 1974), waren an der Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol zwei O-methylierende Kompartimente beteiligt: ein hochaffines (K_m = 7.2 µM) und ein niederaffines (K_m = 330 µM) System (Abb. 3; Tabelle 1). Beide Systeme setzten sich sehr schnell mit der Substratkonzentration im Inkubationsmedium ins Gleichgewicht, denn die Geschwindigkeit, mit der der Metabolit gebildet wurde, war bei niedrigen (hochaffines System) und hohen (niederaffines System) Substratkonzentrationen vom Beginn der Inkubation an konstant, so daß bereits nach Ablauf von 1 min initiale Umsatzgeschwindigkeiten gemessen werden konnten (Abb. 1). Die sättigungskinetischen Konstanten des hochaffinen Systems lagen im gleichen Größenordnungsbereich wie die, die für das hochaffine System der Katzennickhaut ermittelt wurden. Ein Vergleich dieser Konstanten mit allen anderen, bisher bekannten kinetischen Parametern O-methylierender Systeme (im Rattenherzen und in der Kaninchenaorta wurde ein niederaffines O-methylierendes System nicht gefunden) zeigt, daß sich all diese Konstanten nur wenig voneinander unterscheiden (Tabelle 2). Das Hauptmerkmal der Ergebnisse in Tabelle 2 ist, daß die Speicheldrüse erstaunlich gut in den Rahmen der Ergebnisse paßt, die an den anderen Organen erhoben wurden, und daß die O-Methylierung von Noradrenalin und Isoproterenol in der überwiegenden Mehrzahl der bisher publizierten Ergebnisse mit Substratkonzentrationen von weniger als 10 µM halbmaximal gesättigt werden kann.

Im Gegensatz zu Befunden an der Katzennickhaut, die dadurch gekennzeichnet waren, daß nur die hochaffine O-Methylierung durch Corticosteroide hemmbar war (Graefe und Trendelenburg, 1974), wurde die O-Methylierung in beiden Kompartimenten der Speicheldrüse durch Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme beeinträchtigt. Das heißt, in der Speicheldrüse ist offensichtlich die gesamte O-Methylierung eine Folgereaktion der extraneuronalen Auf-

Tabelle 2.

Sättigungskinetische Konstanten des hochaffinen O-methylierenden Systems verschiedener Organe (Zusammenstellung aus der Literatur und eigene Ergebnisse)

Organ	Substrat	K_m (μM)	V_{max} ($nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)	Literatur
Nickhaut der Katze	^3H-(-)NA	7.5	0.73	Graefe und Trendelenburg (1974)
Nickhaut der Katze	^3H-(±)ISO	12.8	3.33	Graefe und Trendelenburg (1974)
Rattenherz	^3H-(±)ISO	3.3	2.00	Bönisch (1978)
Rattenherz	^3H-(-)NA	1.7	1.21	Fiebig und Trendelenburg (1978)
Kaninchen-aorta	^3H-(-)NA	3.6	0.60	Henseling (1978)
Submandibulardrüse der Ratte	^3H-(±)ISO	7.2	1.20	eigene Ergebnisse

NA = Noradrenalin; ISO = Isoproterenol

nahme, während in der Nickhaut nur der hochaffine Anteil von der extraneuronalen Aufnahme kontrolliert wird. Dieser Organ- oder Speziesunterschied wird dadurch unterstrichen, daß in der Nickhaut der Katze die extraneuronale Aufnahme und Akkumulation von Katecholaminen nicht sättigungsfähig und kaum Corticosteroid-empfindlich war (Graefe und Trendelenburg, 1974). Im Gegensatz dazu war die extraneuronale Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol in der Speicheldrüse sättigungsfähig und wurde durch Corticosteron kompetitiv gehemmt (Major, 1979). Die eigenen Ergebnisse haben die Sättigungsfähigkeit der Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol nicht gezeigt, weil einerseits die Akkumulation des Amins indirekt (d.h. erst nach säulenchromatographischer Auftrennung der Gewebsextrakte) gemessen wurde und dadurch mit einer relativ großen experimentellen Streuung behaftet war, und weil andererseits der gewählte Bereich der Substratkonzentrationen zu klein war, um die Sättigungsfähigkeit zweifelsfrei zeigen zu können. In den Untersuchungen von Major (1979) wurde dagegen die Aminakkumulation direkt in den aufgelösten Gewebsproben gemessen und ein größerer Konzentrationsbereich berücksichtigt.

Wie bereits betont, war in der Speicheldrüse nicht nur die Akkumulation des ^{3}H-Isoproterenols, sondern auch der Umsatz in beiden O-methylierenden Kompartimenten durch Normetanephrin und Corticosteron hemmbar. Der Hemmtyp bezüglich der Metabolitproduktion war in beiden Systemen kompetitiv und der mittlere K_i-Wert beider Hemmstoffe (die Ergebnisse, die mit Normetanephrin als Hemmstoff erhoben wurden, wurden mit den Ergebnissen der Corticosteron-Versuche gemittelt) war für beide Systeme etwa gleich groß (19 µM für das hochaffine und 21 µM für das niederaffine System). Diese Beobachtung macht es sehr wahrscheinlich, daß für beide O-methylierende Kompartimente ein einziger zellulärer Aufnahmemechanismus verantwortlich ist. Bei diesem Aufnahmeprozess kann es sich nur um den von Major (1979) charakterisierten Transportprozess (K_m = 311 µM) handeln. Dafür spricht auch die Beobachtung (Major, 1979), daß Normetanephrin und Cor-

ticosteron die glanduläre Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol kompetitiv hemmten und daß die K_i-Werte beider Hemmstoffe (29 µM für Corticosteron und 60 µM für Normetanephrin) sich nur unwesentlich von den oben erwähnten K_i-Werten beider Substanzen als Hemmstoffe der O-Methylierung unterscheiden. Die Ähnlichkeit der K_i-Werte von Corticosteron und Normetanephrin bezüglich der kompetitiven Hemmung der Amin-Aufnahme einerseits und der kompetitiven Hemmung der Amin-O-Methylierung andererseits, legen die Annahme nahe, daß in beiden metabolisierenden Kompartimenten die extraneuronale Aufnahme über einen relativ großen Konzentrationsbereich geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung von ^{3}H-O-Methylisoproterenol war und daß erst bei relativ hohen Substratkonzentrationen die COMT-Aktivität geschwindigkeitsbestimmend wurde. Diese Interpretation der Ergebnisse wird gestützt durch die Beobachtung, daß mit steigenden Substratkonzentrationen ^{3}H-Isoproterenol in zunehmendem Maße unverändert im Gewebe akkumulierte. Es wäre allerdings auch vorstellbar, daß ein Teil des ^{3}H-Isoproterenols in einem Kompartiment des Gewebes akkumuliert, das kaum COMT-Aktivität besitzt. So wurde z.B. bei einer Substratkonzentration von 200 µM (K_m für das niederaffine System: 339 µM) eine konstante O-Methylierungsgeschwindigkeit zu einer Zeit gemessen, während der der ^{3}H-Isoproterenol-Gehalt des Gewebes noch stark zunahm (Abb. 1 und 2). Dieser Befund könnte ein Kompartiment widerspiegeln, in dem ^{3}H-Isoproterenol zwar akkumuliert, aber kaum metabolisiert wird. Zu den gleichen Schlußfolgerungen kamen Bönisch et al. (1974) auf Grund ähnlicher Beobachtungen am perfundierten Rattenherzen.

Die Komplexität der Verhältnisse im intakten Gewebe macht es schwer, die Bedeutung der sättigungskinetischen Konstanten der O-methylierenden Systeme zu ergründen. Da, wie oben diskutiert, die extraneuronale Aufnahme über einen gewissen Konzentrationsbereich geschwindigkeitsbestimmend sein dürfte, können die K_m-Werte der Systeme nur ein Gemisch aus dem K_m der Aufnahme und dem K_m der die Kompartimente charakterisierenden COMT darstel-

len. Eines ist jedoch wahrscheinlich, daß nämlich in der Speicheldrüse zwei verschiedene Typen von COMT vorkommen, die sich in ihren kinetischen Konstanten deutlich voneinander unterscheiden. Es gibt einige Befunde in der Literatur, die darauf hindeuten, daß es eine an Zellmembranen gebundene COMT gibt, die Katecholamine mit relativ hoher Affinität umsetzt (Assicot und Bohnon, 1971; Tong und D'Iorio, 1977). Im Gegensatz dazu baut der größte Teil der zellulären COMT, die zytoplasmatische Fraktion (auch "lösliche COMT" genannt), Katecholamine mit relativ niedriger Affinität ab (K_m = 200 - 600 µM; Übersicht bei Guldberg und Marsden, 1975). Es wäre deshalb durchaus möglich, daß die COMT des hochaffinen Systems die an Membranen gebundene COMT-Fraktion widerspiegelt, während die COMT des niederaffinen Systems der zytoplasmatischen COMT-Fraktion entspricht. Andererseits ist es vorstellbar, daß die kinetischen Konstanten partiell gereinigter und isolierter COMT-Präparationen gar nicht mit den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Konstanten vergleichbar sind, denn der möglicherweise zeitraubende biochemische Auftrennungsprozess zur Isolierung der COMT könnte das Enzym aus seiner natürlichen Umgebung reißen und dadurch seine kinetischen Parameter völlig verändern.

Auch wenn die Bestimmung der kinetischen Parameter der COMT im intakten Gewebe zur Zeit noch nicht möglich ist, ist aus den vorliegenden Ergebnissen die Schlußfolgerung erlaubt, daß im intakten Drüsengewebe ein Teil des Systems "extraneuronale Aufnahme plus O-Methylierung" als hochaffiner Inaktivierungsweg funktioniert, der Katecholamine bei Konzentrationen von weniger als 7.2 µM am effektivsten aus der extrazellulären Flüssigkeit eliminiert. Die scheinbar hohe Affinität dieses Systems erklärt, warum Almgren und Jonason (1973) an der Submandibulardrüse der Ratte eine Potenzierung der sekretorischen Wirkung von Noradrenalin durch Corticosteron nur unter Bedingungen beobachtet haben, unter denen die Empfindlichkeit des Organs gegenüber Noradrenalin hoch war, d.h. nach Blockade der neuronalen Aufnahme durch Protriptylin. Wenn die neuronale Aufnahme intakt war, wurde die

Corticosteron-induzierte Potenzierung der sekretorischen Wirkung von Noradrenalin nicht beobachtet, denn unter diesen Bedingungen war die Empfindlichkeit des Organs gegenüber Noradrenalin gering und die Noradrenalin-Dosen, die zur Auslösung eines sekretorischen Effekts benötigt werden, relativ hoch (Almgren und Jonason, 1973). Wenn man die Ergebnisse anderer Autoren berücksichtigt (Kaumann, 1972, Graefe und Trendelenburg, 1974; s. auch Einleitung) ist der Analogieschluß gerechtfertigt, daß die Corticosteron-induzierte Überempfindlichkeit der Speicheldrüsen gegenüber Noradrenalin bei intakter neuronaler Aufnahme deshalb dem Nachweis entging, weil unter diesen Bedingungen die notwendigen Noradrenalindosen hoch genug waren, um das hochaffine O-methylierende System zu sättigen und so seine funktionelle Bedeutung stark zu reduzieren.

Giles und Miller (1967) haben gezeigt, daß U-0521 ein kompetitiver Hemmstoff der zytoplasmatischen COMT (15000·g Überstand des Rattenleber-Homogenats) ist. Die Inhibitor-Konstante (K_i), die diese Autoren für U-0521 bestimmten, beträgt 7.8 µM. Die eigenen Ergebnisse ergaben, daß eine U-0521-Konzentration von 1 µM die hochaffine O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol um etwa 50 % hemmt (Abb. 5 A). Diese Konzentration (1 µM) sollte unter den experimentellen Bedingungen der Versuchsserie von Abb. 5 dem K_i von U-0521 als Inhibitor der hochaffinen COMT entsprechen. Die Diskrepanz zwischen diesem K_i und dem von Giles und Miller (1967) ermittelten K_i-Wert zeigt, daß U-0521 die COMT im intakten Gewebe deutlich effektiver hemmt als im 15000·g Überstand eines Gewebshomogenats. Es gibt zwei Möglichkeiten, diese Diskrepanz zu erklären: Einerseits könnte es sich bei der COMT des hochaffinen Systems um eine COMT-Fraktion handeln (z.B. membrangebundene COMT), zu der U-0521 eine höhere Affinität hat als zur zytoplasmatischen COMT; andererseits könnte U-0521 im intakten Gewebe angereichert werden und deshalb dort stärker wirksam sein als im Homogenat. Die zuletzt genannte Möglichkeit bietet sich an, weil U-0521 im Rattenherzen ein schwacher Inhibitor der extraneuronalen Aufnahme ist (Bönisch et al., 1974; Fiebig und Trendelenburg, 1978 b) und des-

halb ein Substrat des Aufnahme-Carriers sein könnte. In der Speicheldrüse ergaben sich jedoch keine Hinweise für eine inhibitorische Wirkung des U-0521 auf die zelluläre Aufnahme von ^{3}H-Isoproterenol.

Unter experimentellen Bedingungen, unter denen der größte Teil des aufgenommenen ^{3}H-Isoproterenols zu ^{3}H-O-Methylisoproterenol abgebaut wurde (nämlich bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen; 0.2 µM), stellt die Metabolitproduktion ein gutes Maß für die zelluläre Amin-Aufnahme dar. Unter diesen Bedingungen hatten alle untersuchten Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme (Normetanephrin, Corticosteron, 17-ß-Oestradiol und Phenoxybenzamin) deutliche inhibitorische Effekte, ohne daß sich experimentelle Hinweise dafür ergaben, daß diese Substanzen primär die COMT hemmen. Eine Erniedrigung der Na^{+}-Konzentration in der Inkubationslösung von 143 auf 25 mM (die Osmolarität der Lösung wurde durch Saccharose aufrecht erhalten) hatte dagegen keinen hemmenden Einfluß. Dieser negative Befund bestätigt die Ergebnisse von Major (1979), der zeigen konnte, daß die Aufnahme und Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol in den Drüsenzellen nach Blockade der COMT durch eine derartige Veränderung der externen Na^{+}-Konzentration nicht beeinträchtigt wird. Diese Unempfindlichkeit gegenüber Veränderungen der extrazellulären Na^{+}-Konzentration unterscheidet die extraneuronale offenbar von der neuronalen Aufnahme, die durch steigende extrazelluläre Na^{+}-Konzentrationen stimuliert wird und deshalb zu den Na^{+}-abhängigen Membrantransportsystemen gerechnet wird (Iversen, 1975). Gillespie und Towart (1973) haben in Na^{+}-armen Lösungen eine partielle Hemmung der extraneuronalen Akkumulation von Noradrenalin in der glatten Muskulatur der Kaninchenohrarterie beobachtet. Dieser Befund sollte nicht mißdeutet werden, denn die Autoren haben außerdem zeigen können, daß die Hemmung der Noradrenalin-Akkumulation in Na^{+}-armen Lösungen (NaCl durch Saccharose ersetzt) durch die Anwesenheit von Li^{+} (NaCl durch LiCl ersetzt) wieder aufgehoben werden kann. In den erwähnten Na^{+}-abhängigen Transportprozessen ist aber die aktivierende Wirkung von externen Na^{+}-Ionen

sehr spezifisch, d.h. der Membrantransport kann durch kein anderes monovalentes Kation in vergleichbarer Weise stimuliert werden. Die Ergebnisse von Gillespie und Towart (1973) sind deshalb mit der oben gemachten Schlußfolgerung durchaus vereinbar, nämlich daß die extraneuronale Aufnahme nicht zu den Na^+-abhängigen Transportprozessen rechnet.

Wenn unter den zuletzt beschriebenen experimentellen Bedingungen (^{3}H-Isoproterenol-Konzentration 0.2 µM) 118 mM NaCl durch KCl ersetzt wurden, d.h. die K^+-Konzentration in der Inkubationslösung von 5.9 auf 123.9 mM erhöht wurde, kam es zu einer Reduktion der Metabolitproduktion um etwa 50 %. Auch diese Hemmung der O-Methylierung ging eindeutig auf eine Beeinträchtigung der zellulären Substrataufnahme (und nicht auf eine Inhibition der COMT) zurück, denn eine Zunahme des ^{3}H-Isoproterenolgehalts des Gewebes ließ sich unter diesen Bedingungen nicht nachweisen. Eine Beeinträchtigung der Metabolitproduktion vergleichbaren Ausmaßes durch den COMT-Inhibitor U-0521 hatte nämlich eine Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe zur Folge. Daß hohe externe K^+-Konzentrationen die glanduläre ^{3}H-Isoproterenol-Aufnahme und Akkumulation (nach Blockade der COMT) hemmen, ist bereits von Major (1979) berichtet worden. Die eigenen Ergebnisse bestätigen also die von Major (1979) erhobenen Befunde. Auch in anderen Geweben wird die extraneuronale Akkumulation von Katecholaminen durch depolarisierende K^+-Konzentrationen gehemmt (Gillespie und Towart, 1973; Anning et al., 1978). Es ist deshalb der Schluß gerechtfertigt, daß dieser Befund generell für die extraneuronale Aufnahme Gültigkeit hat. K^+-Ionen könnten per se die zelluläre Katecholaminaufnahme hemmen. Es wäre aber auch möglich, daß das Ruhemembranpotential der Zellen eine wichtige Rolle bei der extraneuronalen Aufnahme spielt. Da Katecholamine im physiologischen pH-Bereich hauptsächlich als Kationen vorliegen (protonisierte Amin-Funktion), wäre es durchaus vorstellbar, daß der Carrier-Substrat-Komplex eine positive Ladung durch die Zellmembran schleust. Die Potentialdifferenz

zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle (innen negativ) könnte dann eine treibende Kraft für den Membrantransport darstellen. Das Ruhemembranpotential der Drüsenzellen von Speicheldrüsen liegt zwischen -40 und -70 mV und ist hauptsächlich ein K^+-Diffusionspotential (Übersicht bei Petersen, 1976). Eine Erhöhung der externen K^+-Konzentration von 5.9 auf 123.9 mM sollte deshalb das Membranpotential der Drüsenzellen drastisch reduzieren.

Das extraneuronale O-methylierende System erfüllt wegen seiner kinetischen Eigenschaften (hohe Affinität für Katecholamine, schnelle Äquilibrierbarkeit) alle Voraussetzungen, eine physiologisch wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Katecholaminen zu spielen. Luchelli-Fortis und Langer (1975) haben an der Nickhaut der Katze gezeigt, daß ein Teil des nach Nervenreiz freigesetzten Noradrenalins durch dieses System aus dem synaptischen Spalt eliminiert wird, daß aber eine Hemmung dieses Systems (durch Hydrocortison) die Antwort des Organs auf den Reiz nicht verstärkt. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, daß das O methylierende System im sympathisch dicht innervierten Organ (und die Nickhaut der Katze ist der Prototyp dieser Gruppe von Organen) an der Inaktivierung des aus den sympathischen Nervenendigungen freigesetzten Noradrenalins in funktionell wichtiger Weise beteiligt ist. In Organen und Geweben aber, in denen die sympathischen Nervenendigungen nur spärlich vertreten sind, könnte es für die Elimination der Katecholamine aus der extrazellulären Flüssigkeit verantwortlich sein. Das zeigen besonders Versuche an größeren arteriellen Gefäßen (die nur im Bereich der Adventitia sympathisch innerviert sind), an denen Hemmstoffe der extraneuronalen Aufnahme oder Inhibitoren der COMT die Wirkung exogener Katecholamine auch unter Bedingungen verstärken, unter denen die neuronale Aufnahme als zusätzlicher Inaktivierungsmechanismus intakt ist. Ist auch noch nicht ganz geklärt, ob von Nervenenden freigesetztes Amin zu einem wesentlichen Prozentsatz vom extraneuronalen Gewebe aufgenommen und O-methyliert wird, so ist das für exogenes Amin zweifelsfrei der Fall (siehe diese Arbeit und viele andere). Berück-

sichtigt man weiterhin, daß Adrenalin eher extraneuronal als neuronal "eliminiert" wird (Paiva und Guimarães, 1978), so sprechen diese beiden Punkte eigentlich sehr dafür, daß das extraneuronale System sehr wohl physiologisch an der Elimination der im Blute zirkulierenden Nebennierenmarkshormone (Adrenalin und Noradrenalin) beteiligt ist.

E) Zusammenfassung

1) Die Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol wurde unter in-vitro Bedingungen in der Submandibulardrüse der Ratte untersucht. Der O-methylierte Metabolit des ^{3}H-Isoproterenols, das ^{3}H-O-Methylisoproterenol, wurde durch ein säulenchromatographisches Verfahren (unter Verwendung von Al_2O_3 und Dowex 50W x 4) vom ^{3}H-Isoproterenol getrennt.

2) Die Geschwindigkeit, mit der das ^{3}H-O-Methylisoproterenol im Drüsengewebe gebildet wurde, war vom Beginn der Inkubation mit ^{3}H-Isoproterenol an konstant, d.h. das metabolisierende Kompartiment setzte sich mit dem Inkubationsmedium sehr schnell in ein Gleichgewicht. Bei einer Inkubationsdauer von bis zu 2 min war die insgesamt gebildete Metabolitenmenge im Gewebe zu finden, so daß bei 1-minütigen Inkubationen die Analyse des Gewebes allein ausreichte, um initiale Umsatzgeschwindigkeiten zu messen.

3) Während nach einer Inkubation mit niedrigen Substratkonzentrationen (0.2 µM) kaum unverändertes ^{3}H-Isoproterenol im Gewebe akkumulierte, kam es bei höheren und hohen Substratkonzentrationen (> 5 µM) zur intrazellulären Akkumulation des Amins. Obwohl der zelluläre ^{3}H-Isoproterenolgehalt während der ersten Minuten der Inkubation stark zunahm (hohe Substratkonzentrationen), blieb die Geschwindigkeit, mit der das ^{3}H-O-Methylisoproterenol gebildet wurde, konstant.

4) Die Metabolisierung und die intrazelluläre Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol war in Gegenwart von Hemmstoffen der extraneuronalen Aufnahme (30 µM Normetanephrin, Corticosteron, 17-β-Oestradiol oder Phenoxybenzamin) deutlich beeinträchtigt. Der Inhibitor der COMT, 3',4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon, hemmte konzentrationsabhängig die O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol ($ED_{50} \sim$ 1 µM) und bewirkte bei niedrigen Substratkonzentrationen (0.2 µM) eine dem Ausmaß der Hemmung der Metabolisierung entsprechende Steigerung der intrazellulären

Akkumulation von ^{3}H-Isoproterenol.

5) Während eine Erniedrigung der Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium keinen Einfluß auf die zelluläre Aufnahme und O-Methylierung von ^{3}H-Isoproterenol hatte, führten hohe externe K^+-Konzentrationen zu einer deutlichen Hemmung der ^{3}H-Isoproterenolaufnahme (und O-Methylierung).

6) Die initiale Metabolisierungsgeschwindigkeit ließ sich mit steigenden Substratkonzentrationen (0.2 - 300 µM) sättigen. Die Analyse der Sättigungsfunktion ergab, daß an der Metabolisierung von ^{3}H-Isoproterenol zwei sättigungsfähige Komponenten beteiligt sind: ein hochaffines System (K_m = 7.2 µM; V_{max} = 1.2 nMol · g^{-1} · min^{-1}) und ein niederaffines O-methylierendes System (K_m = 339 µM; V_{max} = 4.6 nMol · g^{-1} · min^{-1}). Die Funktion beider Systeme wurde durch Normetanephrin und Corticosteron (K_i = 19-21 µM) kompetitiv gehemmt.

7) Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Submandibulardrüse der Ratte bezüglich der hochaffinen O-Methylierung von Katecholaminen nicht von anderen Organen verschiedener Spezies unterscheidet. Die mögliche physiologische Bedeutung des hochaffinen Systems bei der Elimination von Katecholaminen aus dem zirkulierenden Blut wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

ALMGREN, O., JONASON, J.: Relative importance of neuronal and extraneuronal mechanisms for the uptake and retention of noradrenaline in different tissues of the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 270, 289 - 309 (1971)

ALMGREN, O., JONASON, J.: The effect of corticosterone on extraneuronal amin uptake and effector response in rat salivary glands. J. Pharm. Pharmac. 25, 537 - 543 (1973)

ALMGREN, O., JONASON, J.: On the role of the adrenergic receptors for extraneuronal amine uptake and retention in rat salivary glands in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 21 - 35 (1974)

ALMGREN, O., JONASON, J.: Extraneuronal uptake and metabolism in rat salivary glands. In: Proceedings of the VIth International Congress of Pharmacology (J. Tuomisto and M.K. Paasonen, eds.), Vol. 2 (Neurotransmission), pp. 105 - 115, Helsinki 1975

ALMGREN, O., JONASON, J.: Extraneuronal amine transport in glandular tissue. In: The mechanisms of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D.M. Paton, ed), pp. 229 - 311. New York: Raven Press 1976

ANDÉN, N.-E., CARLSSON, A., WALDECK, B.: Reserpine-resistent uptake mechanisms of noradrenaline in tissue. Life Sci. 2, 889 - 894 (1963)

ANNING, E. N., O'DONNELL, R. S., WANSTALL, J. C.: Extraneuronal accumulation of isoprenaline in guinea-pig trachea, atria and uterus: a histochemical and pharmacological study. Br. J. Pharmac. 62, 472 (1978)

ASSICOT, M., BOHUON, C.: Presence of two distinct catechol-O methyl transferase activities in red blood cells. Biochemie 53, 871 - 874 (1971)

BESSE, J. C., BASS, A. D.: Potentation by hydrocortison of responses to catecholamines in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 224 - 238 (1966)

BLASCHKO, H.: Amine oxidase and amine metabolism. Pharmacol. Rev. 4, 415 - 458 (1952)

BODGANSKI, D. F., BRODIE, B. B.: The effects of inorganic ions on the storage and uptake of ^{3}H-norepinephrine by rat heart slices. J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 181 - 189 (1969)

BÖNISCH, H.: Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 121 - 131 (1978)

BÖNISCH, H., TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 191 - 218 (1974)

BÖNISCH, H., UHLIG, W., TRENDELENBURG, U.: Analysis of the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 223 - 244 (1974)

Burn, J. H.: The action of tyramine and epinephrine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 46, 75 - 95 (1932)

CALLINGHAM, B. A., BURGEN, A.S.V.: The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. Mol. Pharmacol. 2, 37 - 42 (1966)

CLARKE, D. E., JONES, C. J., LINLEY, P. A.: Histochemical fluorescence studies on noradrenaline accumulation by uptake$_2$ in the isolated rat heart. Brit. J. Pharmacol. 37, 1 - 9 (1969)

EHINGER, B., SPORRONG, B.: Neuronal and extraneuronal localisation of noradrenaline in the rat heart after perfusion at high concentrations. Experientia (Basel) 24, 265 - 266 (1968)

FALCK, B., HILLARP, N.-A., THIEME, G., TORP, A.: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10, 348 - 354 (1962)

FARNEBO, L.-O., MALMFORS, T.: Histochemical studies on the uptake of noradrenaline and alpha-methyl-noradrenaline in the perfused rat heart. Europ. J. Pharmacol. 5, 313 - 320 (1969)

FIEBIG, E. R., TRENDELENBURG, U.: The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 303, 21 - 35 (1978 a)

FIEBIG, E. R., TRENDELENBURG, U.: The kinetic constants for the extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 37 - 45 (1978 b)

FISCHER, J. E., KOPIN, I. J., AXELROD, J.: Evidence for extraneuronal binding of norepinephrine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 147, 181 - 185 (1965)

GILES, R. E., MILLER, J. W.: A comparsion of certain properties of catechol-O-methyl transferase to those of adrenergic beta receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 201 - 206 (1967)

GILLESPIE, J. S.: Extraneuronal uptake of catecholamines in smooth muscle and connective tissue. In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D. M. Paton, ed.), pp. 325 - 358, New York: Raven Press 1976

GILLESPIE, J. S., TOWART, R.: Uptake kinetics and ion requirements for extraneuronal uptake of noradrenaline by arterial smooth muscle and collagen. Br. J. Pharmac. 47, 556 - 567 (1973)

GILLIS, C. N., PATON, D. M.: Cation dependence of sympathetic transmitter retention by slices of rat ventricle. Br. J. Pharmac. Chemother. 29, 309 - 318 (1967)

GRAEFE, K.-H., BÖNISCH, H., KELLER,B.: Saturation kinetics of the adrenergic neurone uptake system in the perfused rabbit heart. A new method for determination of initial rates of amine uptake. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 263 - 273 (1978)

GRAEFE, K.-H., STEFANO, F.J.E., LANGER, S.Z.: Preferential metabolism of (-)-^{3}H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens. Biochem. Pharmacol. 22, 1147 - 1160 (1973)

GRAEFE, K.-H., TRENDELENBURG, U.: The effect of hydrocortisone on the sensivity of the isolated nictitating membrane to catecholamines. Relationship to extraneuronal uptake and metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 1 - 48 (1974)

GULDBERG, H.C., MARSDEN, C.A.: Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. Pharmacol. Rev. 27, 135 - 206 (1975)

HAEUSLER, G., THOENEN, H., HAEFELY, W., HUERLIMAN, A.: Electrical events in cardiac adrenergic nerves and noradrenaline release from the heart induced by acetylcholine and KCL, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. exp. Path. 261, 389 - 411 (1968)

HAMBERGER, B., NORBERG, K.-A., OLSON, L.: Extraneuronal binding of catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) in salivary glands. Acta physiol. scand. 69, 1 - 12 (1967)

HENDLEY, E.D., SNYDER, S.H.: Steroselectivity of catecholamine uptake in noradrenergic and dopaminergic peripheral organs. Europ. J. Pharmacol. 19, 56 - 66 (1972)

HENSELING, M.: Contribution by neuronal and extraneuronal mechanisms to the elimination of noradrenaline from the extracellular space (rabbit aorta). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, Suppl. R 50 (1978)

HENSELING, M., GRAEFE, K.-H., TRENDELENBURG, U.: The rate constants for the efflux of the metabolites of noradrenaline from rabbit aortic strips. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 207 - 215 (1978)

HERTTING, G.: The fate of ^{3}H-isoproterenol in the rat. Biochem. Pharmacol. 13, 1119 - 1128 (1964)

HERTTING, G., AXELROD, J., KOPIN, I.J., WHITBY, L.G.: Lack of uptake of catecholamines after chronic denervation of sympathetic nerves. Nature (London) 189, 66 (1961)

IVERSEN, L.L.: The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. Brit. J. Pharmacol. 21, 523 - 537 (1963)

IVERSEN, L.L.: The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. Brit. J. Pharmacol. 25, 18 - 33 (1965)

IVERSEN, L.L.: The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1967

IVERSEN, L.L.: Uptake processes for biogenic amines. In: Handbook of Psychopharmacology, L. L. Iversen, S. D. Iversen und S. H. Snyder (Herausgeber), Vol. 3, Seite 381 - 442, Plenum Press, New York und London 1975

IVERSEN, L.L., GLOWINSKI, J., AXELROD, J.: The physiological disposition and metabolism of norepinephrine in immunosympathectomized animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 151, 273 - 284 (1966)

IVERSEN, L.L., JARROTT, B., SIMMONDS, M.A.: Differences in the uptake, storage and metabolism of (+)- and (-)-noradrenaline. Brit. J. Pharmac. 43, 845 - 855 (1971)

IVERSON, L.L., KRAVITZ, E.A.: Sodium dependence of transmitter uptake at adrenergic nerve terminals. Mol. Pharmacol. 2, 360 - 362 (1966)

IVERSEN, L.L., SALT, P.J.: Inhibition of catecholamine uptake$_2$ by steroids in the isolated rat heart. Brit. J. Pharmacol. 40, 528 - 530 (1970)

JONASON, J.: Metabolism of dopamine and noradrenaline in normal, atrophied and postganglionically sympathectomized rat salivary glands in vitro. Acta physiol. scand. 76, 299 - 311 (1969)

JOHNSON, S.M., DE LA LANDE, I.S.: Action of deoxycorticosterone acetate on the central artery of the rabbit ear. Blood Vessels 15, 231 - 246 (1978)

KALSNER, S.: Mechanism of hydrocortisone potentation of responses to epinephrine and noradrenaline in rabbit aorta. Circ. Res. 24, 383 - 395 (1969)

KALSNER, S.: Sensitization of noradrenaline response by inhibition of extraneuronal uptake in a coronary artery preparation. Brit. J. Pharmac. 51, 453 - 455 (1974)

KAUMANN, A.J.: Adrenergic receptors in heart muscle: relations among factors influencing the sensitivity of the cat papillary muscle to catecholamines. J. Pharmacol. Exp. Ther. 173, 383 - 398 (1970)

KAUMANN, A.J.: Potentation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 273, 134 - 153 (1972)

KIRPEKAR, S.M., WAKADE, A.R.: Release of noradrenaline from the cat spleen by potassium. J. Physiol. (London) 194, 595 - 608 (1968)

LEVIN, J.A., FURCHGOTT, R.F.: Interactions between potentiating agents of adrenergic amines in rabbit aortic strips. J. Pharmacol. Exp. Ther. 172, 320 - 331 (1970)

LIGHTMAN, S.L., IVERSEN, L.L.: The role of uptake$_2$ in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. Br. J. Pharmacol. 37, 638 - 649 (1969)

LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666 (1934)

LUCHELLI-FORTIS, M.A., LANGER, S.Z.: Selective inhibition by hydrocortisone of ^{3}H-normetanephrine formation during ^{3}H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287, 261 - 275 (1975)

MAJOR, H.: Kinetik der Aufnahme von ^{3}H-(+)-Isoproterenol in das Drüsengewebe der Glandula submandibularis der Ratte. Ein Beitrag zur Untersuchung der extraneuronalen Aufnahme von Katecholaminen. Inaugural-Dissertation, Würzburg 1980

MORGAN, H.E., HENDERSON, M.J., REGEN, D.M., PARK, C.R.: Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated perfused heart of normal rats. J. Biol. Chem. 236, 253 - 261 (1961)

O'DONNELL, S.R., SAAR, N.: The uptake kinetics and metabolism of extraneuronal noradrenaline in guinea-pig trachea as studied with quantitative fluorescence microphotometry. Br. J. Pharmac. 62, 235 - 239 (1978)

PAIVA, M.Q., GUIMARÃES, S.: A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 221 - 228 (1978)

PATON, D.M.: Characteristics of uptake of noradrenaline by adrenergic neurons. In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (Herausgeber: D.M Paton), Seite 49 - 66. New York: Raven Press 1976

PETERSEN, O.H.: Electrophysiology of mammalian gland cells. Physiol. Rev. 56, 535 - 577 (1976)

RAAB, W., GIGEE, W.: Specific avidity of the heart muscle to absorb and store epinephrine and norepinephrine. Circulation 3, 553 - 558 (1955)

SALT, P.J.: Inhibition of noradrenaline uptake$_2$ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. Europ. J. Pharmacol. 20, 329 - 340 (1972)

SEGEL, H.: Biochemical Calculations. New York-London-Sydney-Toronto: John Wiley & Sons 1976

STANDISH, S.M., SHAFER, W.G.: Serial histologic effects of rat submaxillary and sublingual salivary gland duct and blood vessel ligation. J. dent. Res. 36, 866 - 879 (1957)

STRÖMBLAD, B.C.R., NICKERSON, M.: Accumulation of epinephrine and norepinephrine by some rat tissues. J. Pharmacol Exp. Ther. 134, 154 - 159 (1961)

TONG, J.H., D'IORIO, A.: Solubilisation and partial purification of particulate catechol-O-methyl-transferase from rat liver. Can. J. Biochem. 55, 1108 - 1113 (1977)

TRENDELENBURG, U.: Factors influencing the concentration of catecholamines at the receptors. In: Handb. der experimentellen Pharmakologie, Band XXXIII, pp. 726 - 761, (H. Blaschko and F. Muscholl, eds.), Berlin, Heidelberg, NewYork: Springer 1972

TRENDELENBURG, U.: The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines in the heart. In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D.M. Paton ed.), pp. 259 - 280. New York: Raven Press 1976

TRENDELENBURG, U.: Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. Pharmacol. Rev. 15, 225 - 276 (1963)

TRENDELENBURG, U., HENSELING, M.: Factors determining the rate of relaxation of rabbit aortic strips after an exposure to noradrenaline. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 235 - 244 (1976)

TRENDELENBURG, U., HÖHN, D., GRAEFE, K.H., PLUCHINO, S.: The influence of catechol-O-methyl transferase on the sensitivity of isolated organs to catecholamines. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 271, 59 - 92 (1971)

WILIKINSON, G.N.: Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324 - 332 (1961)

WINNE, D.: Zur Auswertung von Versuchsergebnissen: Die Prüfung, ob Kurven sich in ihrem Verlauf unterscheiden. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 250, 383 - 396 (1965)

WHITBY, L.G., AXELROD, J., WEIL-MALHERBE, H.: The fate of ^{3}H-norepinephrine in animals. J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 193 - 201 (1961)

ZAIMIS, E., BERK, L., CALLINGHAM, B.A.: Morphological, biochemical and functional changes in the sympathetic nervous system of rats treated with nerve-growth factor antiserum. Nature (London) 206, 1220 - 1222 (1965)

L e b e n s l a u f

12.3.51	Geburt als Tochter des Angestellten Karl Sauerwein und seiner Ehefrau Hilde, geb. Schmuck in Zeilhard, jetzt Reinheim 5
2.5.57	Einschulung an der Hirschbachschule in Zeilhard
April 1961	Einschulung an der Eleonorenschule in Darmstadt, einem Gymnasium für Mädchen
11.6.69	Reifeprüfung an der Eleonorenschule
1o.4.7O	Beginn des Medizinstudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
24.3.71	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
17.4.73	Ärztliche Vorprüfung
13.1.77	Ärztliche Prüfung
1.3.77	Beginn der Medizinalassistentenzeit am Kreiskrankenhaus in Oberkirch/Baden, wo ich je ein halbes Jahr an der Inneren und der Chirurgischen Abteilung arbeitete.
9.3.78	Approbation als Arzt
3.4.78	Arbeitsbeginn am Institut für Anaesthesiologie der Städtischen Kliniken in Darmstadt, einem Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Frankfurt, wo ich heute noch als Assistenzärztin beschäftigt bin.

Inge Sauerwein